

Humboldt Universität zu Berlin,
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
Institut für Gartenbauwissenschaften,
Fachgebiet Pflanzenzüchtung

DISSERTATION

Anatomische, cytologische und histologische Untersuchungen
zur somatischen Variation in verschiedenen Teilklonen von
Pelargonium zonale `Kleiner Liebling`

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum horticultrarum
(Dr. rer. hort.)

eingereicht an der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl. Ing. agr. Mingyin Li (aus China)

Dekan
der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
Prof. Dr. Uwe Jens Nagel

Gutachter: 1. Prof. Dr. F. Pohlheim
 2. Prof. Dr. M. D. Sacristan
 3. Dr. I. Pinker

eingereicht: 05.10.2004

Datum der Promotion: 08.03.2005

Yin und Yang sind zwei gegensätzliche Grundkräfte in jeder Sache, aber sie liegen ineinander und bedingen einander. Sie befinden sich harmonisch in einem dynamischen Zustand von Veränderung und Gleichgewicht, dadurch entstehen zahlreiche Varianten.

Alte Chinesischen Philosophie (Lao Zi, 500 v. Chr.)



Bibliographische Beschreibung

LI, MING-YIN

Anatomische, cytologische und histologische Untersuchungen zur somatischen Variation in verschiedenen Teilklonen von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling'

107 Seiten, 41 Abbildung (inklusive 106 Photos), 23 Tabellen, 199 Literaturangaben
Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät. Diss. A

Schlagworte: Cytochimäre, Chromosomenzählung, Nukleolus, Polyploidisierung, Anomale Kernteilung, Adventivspross, Somaklonale Variation.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den morphologischen bzw. cytologischen Anomalien eines mutierten Klons der haploiden Sorte 'Kleiner Liebling' von *Pelargonium zonale*, insbesondere mit der Entstehung verschiedener Ploidiestufen in der Epidermis dieses Klons. Klon 5/74/2 ist morphologisch auffällig, weil er stark gekräuselte und stark behaarte Blätter hat, weiterhin treten unregelmäßig stark vergrößerte Epidermiszellen auf.

Bei *Pelargonium zonale* ist die Zellgröße mit der Ploidiestufe der Zellen positiv korreliert, daher kann die Ploidiestufe der Zellen mit Hilfe der Zellgröße indirekt abgeschätzt werden. An histologischen Schnitten wurden die Ploidiestufen verschiedener Zellschichten von Cytochimären durch Chromosomenzählung direkt bestimmt. Die maximale Nukleoluszahl war als Parameter zur Bestimmung der Ploidiestufen der Zellen in *Pelargonium zonale* nicht geeignet.

Durch Bestimmung der Zellgrößen und Chromosomenzählung wurde festgestellt, dass die Epidermis in den Blättern vom Klon 5/74/2 verschiedene Ploidiestufen aufweist. Solche Variabilität trat in den L2- und L3-bürtigen Zellschichten nicht auf. Somit wurde hier erstmals eine Periklinalcytochimäre mit verschiedenen Ploidiestufen in der Epidermis nachgewiesen. Die somatische Variabilität hängt mit dem Wachstum des Gewebes zusammen. Das jüngere Blatt hat sowohl eine niedrigere als auch eine geringere Anzahl von Ploidiestufen als das ältere Blatt.

Die Pflanzen mit behaarten und gekräuselten Blättern vom Klon 5/74/2 waren nicht stabil und trieben die Sprosse mit den stark behaarten oder gekräuselten Blättern oder glatten Blättern mit kurzen Haaren aus. Die Epidermis des gekräuselten und stark behaarten Blattes enthielt wie die des stark behaarten Blattes oder die des gekräuselten Blattes verschiedene Ploidiestufe. Die Epidermiszellen der meisten Pflanzen mit normal glatten Blättern lagen im diploiden Bereich. Die morphologische Kräuselung und Behaarung hing mit dem Auftreten der somatischen Variabilität in Epidermis von Klon 5/74/2 zusammen.

Histologische Untersuchungen an den Pflanzen mit somatischer Variabilität in der Epidermis von Klon 5/74/2 zeigten zwei unterschiedliche Zustände im Sprossscheitel: Beim ersten wird davon ausgegangen, dass die Zellen der L1 Polyploidie sind. Beim zweiten sind die Zellen der L1 haploid. Die Polyploidisierung der Epidermis setzt sich bei dem Wachstum des Blattes fort. Außerdem wurden Sprossscheitel mit diploider L1 und haploider L2 bzw. haploider L3 von Klon 5/74/2 beobachtet, wobei keine Ploidievariation in der Epidermis festgestellt wurde.

Bei den cytologischen Untersuchungen wurden anomale Mitosen mit irregulären Chromosomenanordnungen (multipolare) und -verteilungen und mehrkernige Zellen in der Epidermis von Klon 5/74/2 beobachtet. Als weitere Anomalie traten eingeschnürte Zellkerne in den Epidermiszellen von Klon 5/74/2 auf. Diese Anomalien sind wahrscheinlich ein Resultat von Genmutationen, ausgelöst durch die Mutagenbehandlung der Ausgangspflanze, wobei Gene betroffen sein müssen, die die Regulierung des Zellzykluses betreffen. Auch die unregelmäßigen Polyploidisierungen und damit Polyploidisierung der Epidermis von Klon 5/74/2 sind vermutlich eine weitere Folge der anscheinend gestörten Kontrolle des Zellzykluses.

Es ist gelungen, Adventivpflanzen mit Hilfe eines modifizierten Mediums aus Kallus von adulten Geweben von *Pelargonium zonale* in *in vitro*-Kultur zu regenerieren. Dabei zeigte die Zugabe von Perlit und anschließend PVP die beste Wirkung gegen die Bildung von Polyphenolverbindungen im *Pelargonium*-Gewebe. TDZ ist einer der effektivsten Wachstumsstoffe für die Kallusinduktion und Regeneration der Adventivsprosse bei *Pelargonium*.

Die Blatt- und die Blütenfarbe der Adventivpflanzen aus der waagrecht aufgesetzten Explantaten des dreifach markierten chimärischen *Pelargonium*-Klons 'Weißer Liebling' (WRR, GWG, DHH) stimmten mit dem Genotyp der L1-Zellen überein. Somaklonale Variation in Bezug auf die Ploidiestufe wurde jedoch beobachtet. Die Stomatalängen der Adventivpflanzen aus der senkrecht aufgesetzten Explantaten von Klon 5/74/2 lagen wie die von Klon WL, DHH meistens im Bereich von diploid, nur selten von tetraploid oder gemischten. Die ursprünglich polyploiden und haploiden Zellen der kultivierten Gewebe traten nach der Regeneration nicht mehr auf. Dies weist auf eine Zellmutation und -selektion während der *in vitro*-Kultur hin.

Aus senkrecht aufgesetzten chimärischen Geweben der GWG- und GGW-Varianten von *Pelargonium zonale* 'Mrs. Pollock' wurden Adventivsprosse mit neuen chimärischen Blattmustern in GGW, GWG und Sektorialchimären regeneriert. Das Ergebnis zeigt, dass die Zellen mindestens in L2 und L3-bürtigen Gewebeschichten der Explantaten zur Regeneration der Adventivsprossen teilgenommen haben. Dabei wurden von der GGW-Variante mehr Chimären regeneriert als von der GWG-Variante.

Anatomical, cytological and histological investigation of somatic variation of the different clone of *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling'

107 pages, 41 figures (inclusive of 106 Photos), 23 tables, 199 references,

Berlin, Humboldt University Berlin, Agricultural-Horticultural Faculty. Ph.D. Thesis.

Keywords: cytochimera, chromosome number, nucleolus, Polyploidization, anomalous division, adventitious shoots, somaclonal variation.

Abstract

A mutated clone, 5/74/2, of the haploid 'Kleiner Liebling' of *Pelargonium zonale* was investigated using approaches of formation of different ploidy levels. The leaves of this clone are characterized by a blistered surface, thick hairs and epidermal cells of different sizes. The morphological and the cytological anomalies of this clone were also studied to answer the question that how the different ploidy levels of the epidermis cells were generated.

As the cell size in *Pelargonium zonale* is positively correlated with the ploidy level, it is possible to evaluate the ploidy level indirectly based on the cell size. The ploidy levels of the cells in different layers were determined directly by counting the chromosome numbers in histological longitudinal sections of the cytochimeras. The maximum number of nucleoli was not a suitable parameter for the determination of the ploidy level of the cells in *Pelargonium zonale*.

The cell sizes and chromosome numbers confirmed that epidermal cells of the leaves of clone 5/74/2 differed in the ploidy levels. Such a variability did not appear in L2- and L3-derived cells. Consequently, clone 5/74/2 is a periclinal cytochimera with a mixed ploidy epidermis. This type of cytochimera with different ploidy levels in epidermis has not been reported up to now. The somatic variability is related to the growth of the tissue. The younger leaf has fewer and lower ploidy levels than the older leaf.

The clone 5/74/2 with blistered and hairy leaves is not stable because it also generates hairy shoots or shoots with blistered leaves or shoots with smooth leaf surface and short hairs. The epidermis of the blistered leaf or of the hairy leaf is polyploid with different ploidy levels, like the epidermis of the shoots with blistered and hairy leaves. Epidermis cells of normal shoots are diploid. The morphologically blistered leaf surface seems to be the result of a somatic variability in epidermis.

Histological investigations of the plants with somatic variability of the epidermis of clone 5/74/2 showed two different ways of development of the somatic variability: the cells of the L1 in the apical meristem were already polyploid and the cells in the apical meristem were haploid. The somatic variability of the epidermis occurred during the primordial development and continued with leaf growth. Mixed ploidy of the epidermis in the shoots with diploid L1 cells of plants from clone 5/74/2 was not observed.

Cytological analyses revealed anomalies of the mitosis in epidermis cells of clone 5/74/2. Various irregular chromosomal arrangements (multipolar mitosis), imbalanced chromosomal segregation and polynuclear cells were observed. Additionally, nuclei with constrictions were found. Probably, these anomalies resulted from mutations caused. It is reasonable that regulatory genes of the cell cycle were mutated which led to polyploidisation and thus somatic variability of the epidermal cells of clone 5/74/2. Other effects of the mutation were anomalous mitosis, polynuclear cells and constricted nuclei.

Adventitious shoots were successfully regenerated from callus of adult tissue of *Pelargonium* *in vitro* on modified medium. The combination of Perlite and PVP showed the best effects against the formation of phenolic substances on *Pelargonium* tissues during *in vitro*-culture. TDZ was the most effective substance for callus induction and regeneration of adventitious shoots.

The colour of leaves and flowers in the adventitious plants regenerated from tissue of the triply marked chimera 'Weißer Liebling' (GWG, WRR, DHH) were correlated with the genotype of L1. However, somaclonal variability of ploidy levels was observed. The size of stomata on adventitious plants from the clone 5/74/2 was similar to from DHH-tissue, mostly in the range of diploid, only rarely in tetraploid or mixed ploidy. Derivates of the original polyploid and haploid cells of the cultivated tissue were not found. Evidently, cell selection and mutation occurred during the *in vitro*-culture.

Adventitious shoots with new chimeral patterns (GGW, GWG) and sectorial chimeras were regenerated from chimeral GWG- and GGW-explants of *Pelargonium zonale* 'Ms. Pollock'. More chimeras from GGW explants were obtained than from GWG explants. This result showed that cells in both L2 and L3 derived tissues of the explants were involved in the regeneration of the adventitious shoots. Furthermore, the L3 cells were the main source of adventitious shoot production.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
AZ	Apikale Zone des Sprossscheitels
B5	Nährmedium nach Gamborg et al. (1968)
BAP	Benzyl-6-aminopurine
B-Spross	Spross mit stark behaarten Blättern
D	Diploid
DDD	Diploider Homohistont: diploide L1 – diploide L2 – diploide L3
DHH	Ploidiechimäre: diploide L1 – haploide L2 – haploide L3
G	grün
GGW	Chlorophylldefektchimäre: grüne L1 – grüne L2 – weiße L3
GWG	Chlorophylldefektchimäre: grüne L1 -weiße L2 – grüne L3
GWW	Chlorophylldefektchimäre: grüne L1 – weiße L2 – weiße L3
H	Haploid
HDD	Ploidiechimäre: haploide L1 – diploide L2 – diploide L3
HHH	Haploider Homohistont: haploide L1 – haploide L2 – haploide L3
IAA	Indole-3-acetic acid
KB-Spross	Spross mit gekräuselten und behaarten Blättern
KL	Kleiner Liebling
K-Spross	Spross mit gekräuselten Blättern
L1	Erste Sprossscheitelschicht
L2	Zweite Sprossscheitelschicht
L3	Dritte Sprossscheitelschicht
MS	Murashige & Skoog (1962)
n	Stichprobenumfang
N-Spross	Spross mit glatten und kurzhaarigen Blättern
PVP	Polyvinylpyrrolidone

R	rot
RL	Rosa Liebling
SD	Standardabweichung
T	Tetraploid
TDZ	N-phenyl-N`-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (Thidiazuron)
TTT	Tetraploider Homohistont: tetraploide L1 - tetraploide L2-tetraploide L3
W	weiß
WL	Weißer Liebling
WRR	Anthocyandefektchimäre: weiße L1 – rote L2 – rote L3

Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 1: Schematische Darstellung der Zellschichten im Sprossscheitel	2
Abb. 2: Übersicht über die Entwicklung verschiedener Klone aus <i>Pelargonium zonale</i> 'Kleiner Liebling'	8
Abb. 3: Morphologie der Blätter des untersuchten Klons 5/74/2.	12
Abb. 4: Blattmuster und Blattvariation von 'Mrs. Pollock'.	13
Abb. 5: Querschnitt durch in Kunststoff eingebettete ausgewachsene Laubblätter von verschied- enen Klonen aus <i>Pelargonium zonale</i> 'Kleiner Liebling'.	20
Abb. 6: Gegenüberstellung von Epidermisausschnitten der Klone mit unterschiedlichen Ploidie- stufen aus 'Kleiner Liebling'	22
Abb. 7: Gegenüberstellung der Häufigkeitsdiagramme (Anzahl von Stomata) der Stomatalängen (in µm) verschiedener Klone aus 'Kleiner Liebling'	24
Abb. 8: Gegenüberstellung der Häufigkeitsdiagramme (Anzahl von Stomata) der Stomatalängen (µm) des 1., 3. und 5. Laubblattes von Pflanzen mit unterschiedlichen Ploidiestufen bei verschiedenen Klonen aus 'Kleiner Liebling'	29
Abb. 9: Häufigkeitsdiagramme (Anzahl von Stomata) der Stomatalängen (µm) verschiedener Laubblätter von fünf typischen KB-Sprossen von Klon 5/74/2	30
Abb. 10: Gegenüberstellung von Blättern mit auffälligen Sektoren und von Epidermisabzügen an Klon 5/74/2.	32
Abb. 11: Längsschnitt durch den Sprossscheitel von Sorte 'Kleiner Liebling'	34
Abb. 12: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (µm) der drei Sprossscheitelschichten der haploiden Sorte 'Kleiner Liebling'	34
Abb. 13: Längsschnitt durch den Sprossscheitel des cytochimärischen Klons HDD (haploid-diploid- diploid) von 'Weißer Liebling'.	35
Abb. 14: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (in µm) der drei Sprossscheitelschichten des cytochimärischen Klons HDD von 'Weißer Liebling'.	35
Abb. 15: Längsschnitte durch den Sprossscheitel mit stark vergrößerten Zellen in L1 von Klon 5/74/2.	37
Abb. 16: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgröße (in µm) in drei Sprossscheitelschichten der Pflanze mit stark vergrößerten Zellen in L1 von Klon 5/74/2.	38
Abb. 17: Längsschnitte durch den Sprossscheitel mit kleinen Zellen in L1 von Klon 5/74/2 bei <i>Pelargonium</i>	38
Abb. 18: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (in µm) der Mittelzone der Blütenknospe mit kleinen Zellen in L1 von Klon 5/74/2.	39
Abb. 19: Längsschnitt durch den Sprossscheitel mit leicht vergrößerten L1-Zellen ohne deutliche Zellvergrößerung in der Epidermis bei der Blattentwicklung von Klon 5/74/2.	40
Abb. 20: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (in µm) der Scheitelschichten mit leicht vergrößerten Zellen in L1 von Klon 5/74/2 der Abbildung 19.	40
Abb. 21: Zellgrößenzunahme in der Epidermisschicht in verschiedenen Positionen bei Spross- scheiteln von Klon 5/74/2.	41
Abb. 22: Vergleich der Chromosomen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit 0,1%iger Kolchizinlösung für die Dauerpräparation	42
Abb. 23: Mit Toluidinblau angefärbte Chromosomen und Spindelapparate	44
Abb. 24: Zellen mit erkennbaren Chromosomen in unterschiedlichen Blattschichten des Klons HDD von <i>Pelargonium</i> 'Weißer Liebling'	44

Abb. 25: Zellen mit zählbaren Chromosomen in verschiedenen Blattschichten bei dem cytochimärischen Klon HDD von `Weißer Liebling`.	45
Abb. 26: Zellen mit erkennbaren Chromosomen in verschiedenen Blattschichten des cytochimärischen Klons `Weißer Liebling` DHH.	45
Abb. 27: Zellen mit verschiedenen Chromosomensätzen in der Epidermis von Klon 5/74/2.	46
Abb. 28: Zellen mit 9 Chromosomen der inneren Komponentenschichten von Klon 5/74/2.	47
Abb. 29: Zellkerne mit verschiedener Nukleolusanzahl in dem Klon 5/74/2.	47
Abb. 30: Zellen mit erkennbaren Chromosomen und Nukleoli im Blattlängsschnitt des haploiden Klons `Kleiner Liebling` (Kunststoff-Dauerpräparat).	48
Abb. 31: Normale mitotische Zellteilung in Zellen von Klon 5/74/2.	49
Abb. 32: Gestörte Metaphasen in mitotischen Zellen von Klon 5/74/2.	50
Abb. 33: Epidermiszelle mit unregelmäßiger Chromosomenverteilung in der Anaphase von Klon 5/74/2.	50
Abb. 34: Zellen mit mehreren Kernen in der Epidermis von Klon 5/74/2.	51
Abb. 35: Zellen mit unterschiedlichen Kernen in der Epidermis von Klon 5/74/2.	52
Abb. 36: Kerneinschnürung in Epidermiszellen von Klon 5/74/2.	52
Abb. 37: Kerneinschnürungen in den Epidermiszellen von Klon 5/74/2.	53
Abb. 38: Verminderung der Phenolbildung und Kallusinduktion von <i>Pelargonium zonale</i> .	54
Abb. 39: Ausgangs- und Adventivpflanzen des dreifach markierten chimärischen Klons `Weißer Liebling`, DHH, GWG, WRR.	57
Abb. 40: Chimärische Adventivpflanzen aus der Sorte `Mrs. Pollock`.	59
Abb. 41: Kallusinduktion und Regeneration von Adventivsprossen aus Klon 5/74/2.	60

Tabellesverzeichnis

Seite

Tab. 1: Bestandteile des für die Gewebekultur verwendeten Nährmediums	18
Tab. 2: Zusätze zu den Kulturmedien	18
Tab. 3: Epidermiszellgröße von Laubblattschnitten bei verschiedenen	21
Tab. 4: Länge und Breite der Stomata bei verschiedenen Klonen aus `Kleiner Liebling`	23
Tab. 5: Quotienten der Mittelwerte der Stomatalänge und deren Ploidiestufe in verschiedenen homohistischen Klonen aus <i>Pelargonium zonale</i> `Kleiner Liebling`	26
Tab. 6: Stomatalängen (in µm) des 1., 3. und 5. (bzw. 7) Laubblattes verschiedener Klone aus `Kleiner Liebling`	28
Tab. 7: Stomatalängen der Sprossastriebe im Vergleich zu den Ausgangssports	31
Tab. 8: Stomatalängen in verschiedenen Sektoren auf Blattvariationen von Klon 5/74/2 (Abb. 10)..	33
Tab. 9: Stomatalängen und mögliche Ploidiestufe bei verschiedenen Sprossastriebe von Klon 5/74/2.....	33
Tab. 10: Zellgrößen in den Sprossscheitelschichten der haploiden Sorte `Kleiner Liebling`	35
Tab. 11: Zellgrößen in den Sprossscheitelschichten des cytochimärischen Klons HDD von <i>Pelargonium zonale</i> `Weißer Liebling`	36
Tab. 12: Zellgrößen der drei Sprossscheitelschichten der Pflanzen von Klon 5/74/2 mit stark vergrößerten Zellen in L1	37
Tab. 13: Zellgrößen in Blütenknospenlängsschnitten einer Pflanze mit kleinen Zellen in L1 von Klon 5/74/2.....	39
Tab. 14: Zellgrößen in Sprossscheitellängsschnitten der Pflanze mit leicht vergrößerten Zellen in L1 aus Klon 5/74/2 (siehe Abb. 19)	40
Tab. 15: Effekte der Farbstoffe auf die Beobachtung von Kernteilung und Chromosomen in Dauerpräparaten.....	43
Tab. 16: Chromosomenzahl der verschiedenen Gewebeschichten der verschiedenen Klone von <i>Pelargonium zonale</i> `Kleiner Liebling` bzw. `Weißer Liebling`	46
Tab. 17: Maximale Anzahl der Nukleoli und Chromosomen in verschiedenen Zellschichten bei unterschiedlichen Klonen von `Kleiner Liebling` bzw. `Weißer Liebling`	48
Tab. 18: Effekte der verschiedenen Substanzen im Kulturmedium bei der <i>in vitro</i> -Kultur von <i>Pelargonium zonale</i>	55
Tab. 19: Effekte verschiedener Wachstumsregulatoren und Explantate auf die Kallusinduktion und Regeneration bei <i>Pelargonium zonale</i>	56
Tab. 20: Stomatalängen der <i>in vitro</i> regenerierten Adventivpflanzen aus den dreifach markierten Gewebe von `Weißer Liebling` (DHH, GWG, WRR)	58
Tab. 21: Konstitution der <i>in vitro</i> regenerierten Adventivsprosse aus den Gewebe von <i>Pelargonium</i> `Mrs. Pollock`	59
Tab. 22: Stomatalängen der <i>in vitro</i> regenerierten Adventivpflanzen von Klon 5/74/2	61
Tab. 23: Ploidiestufenverteilungen der Epidermiszellen (%) der Adventivpflanzen von `Weißer Liebling`, DHH, GWG, WRR und Klon 5/74/2	62

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung, Problem- und Zielstellung	1
1.1 Chimären und ihr Entwicklungsmechanismus.....	1
1.2 Ausgangspflanze <i>Pelargonium zonale</i> ‘Kleiner Liebling’ und die aus ihr hervorgegangenen chimärischen Klone	5
1.3 In vitro-Kultur bei <i>Pelargonium zonale</i>	8
1.4 Fragstellungen	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Pflanzenmaterial.....	11
2.2 Untersuchungsmethoden	14
2.2.1 Untersuchungen der Stomatagrößen.....	14
2.2.2 Untersuchung der Chromosomenzahl an Frischpräparaten.....	14
2.2.3 Herstellungen von Dauerpräparaten mit Kunststoff-Einbettung.....	15
2.2.4 In vitro-Kultur mit <i>Pelargonium zonale</i>	17
2.2.5 Bilddokumentation und statistische Auswertung der Daten	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Untersuchung der Zellgrößen zur Ploidiestufenbestimmung verschiedener Klone von <i>Pelargonium zonale</i> ‘Kleiner Liebling’	20
3.1.1 Untersuchung der Epidermiszellgrößen in Laubblattquerschnitten	20
3.1.2 Stomatagrößen in verschiedenen Klonen aus ‘Kleiner Liebling’	21
3.1.3 Das Verhältnis von Stomatalängen zu Ploidiestufen unterschiedlicher Klone aus ‘Kleiner Liebling’	25
3.1.4 Stomatagrößen im Verlauf der Sprossentwicklung unterschiedlicher Klone aus ‘Kleiner Liebling’	27
3.1.5 Stomatamessungen an Entmischungen des Klons 5/74/2	30
3.2 Histologische Untersuchungen an Sprossspitzen von <i>Pelargonium zonale</i>	34
3.2.1 Zellgröße in Sprossspitzenzellen verschiedener Klone aus ‘Kleiner Liebling’ ..	34
3.2.2 Entwicklungen der L1-Zellen in Sprossspitzen von Klon 5/74/2.....	36
3.2.3 Entwicklungen der Epidermiszellen im Blatt von Klon 5/74/2.....	41
3.3 Chromosomenzählungen in cytochimärischen Geweben	42
3.3.1 Einflussfaktoren für die Chromosomenbestimmung.....	42
3.3.2 Chromosomenzahlen in verschiedenen somatischen Zellschichten des Blatt- gewebes unterschiedlicher Klone	44

3.3.3	Chromosomenzahlen in somatischen Zellschichten des Blattgewebes von Klon 5/74/2.....	46
3.3.4	Nukleolusanzahl in Zellkernen verschiedener Ploidiestufen	47
3.4	Cytologische Beobachtungen in Epidermiszellen von Klon 5/74/2.....	49
3.4.1	Reguläre mitotische Zellteilung der Epidermis	49
3.4.2	Cytologische Anomalien in Epidermiszellen	50
3.5	In vitro-Kultur mit periklinalen Chimärgeweben von <i>Pelargonium zonale</i>	54
3.5.1	Verfahrensoptimierung der Gewebekultur	54
3.5.2	Einfluss der Zellschichtposition auf die Adventivsprossregeneration	57
3.5.3	Chimärenkonstitution der Adventivpflanzen von 'Mrs. Pollock'	58
3.5.4	Ploidiestufe der Adventivpflanzen von 5/74/2	60
4	Diskussion	63
4.1	Indirekte und direkte Ploidiebestimmungen	63
4.1.1	Indirekte Ploidiebestimmung über den Zellgrößenvergleich	63
4.1.2	Indirekte Ploidiebestimmung über die maximale Nukleolizahl der Zellkerne.....	64
4.1.3	Direkte Ploidiebestimmung durch Chromosomenzählung.....	65
4.2	Entwicklung der somatischen Variabilität in Klon 5/74/2	66
4.3	Morphologische Besonderheit und somatische Variabilität von Klon 5/74/2	68
4.4	Austrieb von N-Sprossen an Pflanzen von Klon 5/74/2	68
4.5	Cytologische Anomalien in der Epidermis von Klon 5/74/2	69
4.6	Mediumoptimierung zur Kallusinduktion und Regeneration von Adventivsprossen bei <i>Pelargonium zonale</i>	71
4.7	Kompetenz der Zellen zur in vitro-Regeneration bei <i>Pelargonium zonale</i>	71
4.8	In-vitro-Regeneration von Chimären	72
4.9	Somaklonale Variation der Adventivpflanzen aus <i>Pelargonium zonale</i>	73
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	78

1 Einleitung, Problem- und Zielstellung

An *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' konnten nach spontaner und induzierter Mutation zahlreiche Varianten ausgelesen und ein umfangreiches Klonsortiment etabliert werden, das eine Vielzahl von Chimären umfasst (POHLHEIM *et al.* 1972; POHLHEIM & POHLHEIM 1974; POHLHEIM 1978; POHLHEIM & RÖSSEL 1989). Im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit steht der Klon 5/74/2, der durch abnorme Ploidieverhältnisse in der Epidermis auffällt. Die histologischen Untersuchungen von Sprossspitzenschnitten feststellte jedoch, dass die Polyploidisierung nicht schon im Sprossscheitel, sondern erst bei der Blattentwicklung stattgefunden hat (LIEBAU 1988). Da als Hypothese davon ausgegangen wird, dass es sich bei diesem Klon ebenfalls um eine ungewöhnliche Cytochimäre handeln könnte, wird im Folgenden auf das Klonsortiment, auf die Entstehung von Chimären und von somatischen Variabilität sowie auf die Entmischung näher eingegangen.

1.1 Chimären und ihr Entwicklungsmechanismus

In der Regel ist die genetische Information in allen Zellen und Zellschichten einer Pflanze identisch. Mutationen finden in einzelnden Zellen statt und erfolgt meist nicht in allen Zellen des Sprossscheitels in der Pflanze, sondern nur in einem Teil (oft ist es nur eine Schicht oder ein Sektor). Teilen sich sowohl mutierte als auch unmutierte Zelltypen im meristematischen Gewebe, können sich die ursprünglichen und die veränderten Zellen in unterschiedlichen Schichten oder Sektoren im Scheitel anordnen. Solche intraapikalen Heterohistonten werden als Chimären bezeichnet und es können somit mindestens zwei oder auch drei verschiedene Genotypen in einer Chimäre vereinigt sein (BERGANN & BERGANN 1959; BERGANN 1967).

Der Terminus 'Chimäre' wurde als erstes von WINKLER (1907) für Pflanzen benutzt. Er bezeichnete die neue Pflanze, die aus dem Verwachsungsgewebe einer Pfropfung entstand, als Chimäre. BAUR (1909) entwickelte den Begriff der Chimäre durch anatomische Untersuchungen an *Pelargonium zonale* (L.) mit zwei neuen Begriffen weiter: Periklinal- und Sektorialchimäre. Bei Periklinalchimären sind die genetischen Veränderungen in mindestens einer bzw. in verschiedenen Schichten des Sprossscheitels zu beobachten

(POHLHEIM 1983; 1984). Bei einer Sektorialchimäre ist in der Regel nur ein Sektor aller Sprossscheitelschichten von der genetischen Veränderung betroffen.

Histologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Sprossscheitel der meisten dikotylen Pflanzen aus drei unabhängigen Schichten besteht (STEWART & BURK 1970; STEWART & DERMEN 1970; 1975; GIFFORD & CORSON 1971; HOWARD 1978; STEWART 1978; HUALA & SUSSEX 1993) (Abb. 1).

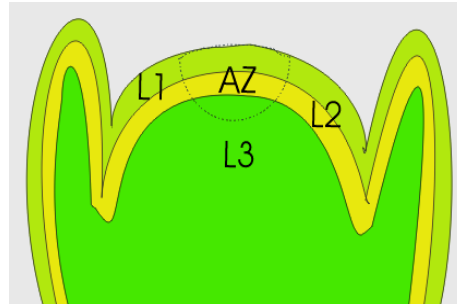


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zellschichten im Sprossscheitel (nach GIFFORD & CORSON 1971; HUALA & SUSSEX 1993, modifiziert). AZ: Apikale Zone; L1 bis L3: Zellschicht 1-3.

Dabei haben die Zellen der apikalen Zone (AZ) eine höhere Initiative (GIFFORD & CORSON 1971; SESSIONS, 2000; FLETCHER, 2002). Die Zellen teilen sich in den äußeren zwei Tunicaschichten (L1, L2, L= Layer) in der Regel antiklin und die Zellen der inneren Corpusschicht (L3) teilen sich sowohl periklin als auch antiklin (BARTON & POETHIG 1993; FLETCHER & MEYEROWITZ 2000). Diese Besonderheit in den Teilungsrichtungen hat zur Folge, dass in den Sprossscheiteln höherer Pflanzen in der Regel drei Zellschichten unabhängig übereinander existieren. Da genetische Änderungen in der Regel Ein-Zell-Akte sind, bleiben sie primär auf eine Zellschicht, L1, L2 oder L3, beschränkt (POHLHEIM, 2003).

Die erste Schicht (L1) bildet in der Regel die Epidermis, die zweite Schicht (L2) die Subepidermis, das Palisadengewebe, Teile des Schwammparenchyms (BURK *et al.* 1964) und die Gameten (SIMON 2001). Die L3 ist für die Ausbildung des inneren Gewebes, des Schwammparenchyms, des Markgewebes sowie der Stecklingswurzel verantwortlich (BATESON 1916; 1926; BERGANN 1967; POETHIG 1984).

Der Begriff der Meriklinalchimäre wurde von JÖRGENSEN & CRANE (1927) hinzugefügt. Bei einer Meriklinalchimäre begrenzt sich die genetische Veränderung auf

einen Bereich einer Sprossscheitelschicht. Eine Meriklinalchimäre ist instabil und entwickelt sich im weiteren Verlauf zu einer Periklinalchimäre oder zu einem Homohiston.

BERGANN & BERGANN (1962) teilten die Periklinalchimären nach der Anordnung der verschiedenen Genotypen im Sprossscheitel in drei weitere Typen ein: Monektochimären, Diektochimären und Mesochimären. Monektochimären haben eine mutierte äußerste Schicht und zwei unmutierte innere Schichten bzw. umgekehrt. Diektochimären besitzen zwei genetisch gleiche äußere Schichten und eine davon genetisch verschiedene innere Schicht. Bei Mesochimären sind die erste und dritte Scheitelschicht genetisch gleich. Die dazwischen liegende Scheitelschicht ist andersartig. Wenn alle drei Schichten im Sprossscheitel unterschiedlich sind, nennt man das Trichimäre (BERGANN 1961; POHLHEIM 1977). Trichimären sind selten.

Pflanzliche Chimären können anhand des genetischen Unterschiedes der Zellen klassifiziert werden (TILNEY-BASSETT 1963; 1986; RIEGER *et al.* 1991; PLASCHIL 1997; HAGEMANN 2000): Artchimären (klassische Pfropfmischlinge), Cytochimären (Unterschiede in der Chromosomenzahl: diploid-tetraploid, euploid, aneuploid, usw.), Plastidenchimären (durch erbliche Plastiden-Unterschiede, z.B. Blattmuster G-W-G: G = grüne normale, W = defekte weiße), Mitochondrienchimären (durch erbliche Mitochondrien-Unterschiede), Anthocyanchimären (durch erbliche Anthocyan-Unterschiede, z. B. Blütenmuster (oder Blattmuster), W-R-R: W = weiß, R = rot). Plastidenchimären und anthocyanchimären lassen sich durch charakteristische Farbverläufe des Blatt- und Blütenmusters erkennen.

Die Ploidiestufen verschiedener Schichten von cytochimärischen Pflanzen lassen sich nicht durch Chromosomenzählung nach der klassischen Quetsch-Methode von Spross- bzw. Wurzelspitzen bestimmen, da nach der Quetschung die Zellen nicht mehr den entsprechenden Sprossscheitelschichten zugeordnet werden können und die Wurzel meist nur der inneren Komponente (L3) entstammt (BATESON 1916). Jedoch können Ploidiemutationen in L3 anhand der Zellen in der Wurzelspitze nachgewiesen werden (DAKER 1967).

Die Bestimmung der Ploidiestufen in verschiedenen Zellschichten von *Datura* erfolgte bei SATINA *et al.* (1940) durch den Vergleich der Zellgröße in verschiedenen Scheitelschichten. Die Ploidiestufe in L1- und L2-bürtigen Zellen kann auch durch den Vergleich

der Stomata- und Pollengröße indirekte bestimmen (TILNEY-BASSETT 1986). ADANIYA & ARDIAN (1994) schlugen vor, durch die maximale Nukleoluszahl der Stomata und Pollen die Ploidiestufe in L1- und L2-bürtigen Zellen indirekt zu bestimmen. Die Bestimmung der Anzahl von Nukleoli hat einen Vorteil im Vergleich zur Bestimmung der Chromosomenzahl. Da Nukleoli in der Interphase auftreten, lassen sie sich länger beobachten und einfacher in den verschiedenen Zellschichten zählen.

SATINA et al. (1940) und OLBRICHT (1998) hatten zählbare Chromosomen in histologischen Schnitten von *Datura* sowie *Petunia*. ZONNEVELD & IREN (2000) zeigten, dass man mit Hilfe des modernen Verfahrens der Flow Cytometrie unterschiedliche Ploidiestufen in einem Pflanzeorgan (Blattspreite) nachweisen kann. Allerdings lassen sich damit die Ploidiestufen nicht den Zellschichten zuordnen. Deswegen ist es notwendig, Methoden zur direkten Ploidiebestimmung durch Chromosomenzählung anzuwenden. In der vorliegenden Arbeit soll bei *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' die Chromosomenzählung bei in Kunststoff eingebetteten histologischen Dauerdünnschnitten daraufhin geprüft werden.

Chimärische Muster können sich durch die Umlagerung von Zellschichten auf drei unterschiedlichen Wegen verändern (BERGANN & BERGANN 1962; POHLHEIM 1986; LIEBAU 1988): Reduplikation (Schichtenverdoppelung von Zellen der äußeren Schicht infolge perikliner Teilung unter gleichzeitiger Verdrängung der Zellen der inneren Schicht), Perforation (Schichtendurchbruch der Zellen der äußeren Schichten und die Zellen der darunter liegenden Schicht treten in das Gewebe ein) und Translokation (Austausch von Zellen der Schichten).

Eine stabile Vermehrung von Chimären ist nur auf vegetativem Weg z.B. durch Stecklinge oder Tochterzwiebeln möglich (BROERTJES et al. 1968; POHLHEIM 1985; CARPENTER & COEN 1995). Da Gameten in der Regel L2-bürtig sind, repräsentieren generative Nachkommen den Genotyp der L2. Chimären spielen zwar in der generativ vermehrten landwirtschaftlichen Produktion keine Rolle, sie können aber für die Klonzüchtung wie Obst, Kartoffeln eine Rolle spielen. Chimären sind für die Klonzüchtung im Zierpflanzenbau besonders von Bedeutung. So können beispielsweise aus einer Periklinalchimäre, die weiß und grün markiert ist, durch Umlagerungen 2^3 unterschiedliche Schichtkonstitutionen entstehen und somit fünf neuartige Periklinalchimären. Darüber hinaus können Chimären zu ihren genetisch unterschiedlichen Komponenten entmischen

und Homohistonten mit neuen Merkmalen bilden. Das Entmischungsverhalten der Chimären gilt gleichzeitig als Kriterium des Nachweises von Chimären.

1.2 Ausgangspflanze *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' und die aus ihr hervorgegangenen chimärischen Klone

Pelargonium zonale (L.) L'HERIT. ex. Ait. 'Kleiner Liebling' (syn. *Pelargonium x hortorum* BAILEY 'Kleiner Liebling') ist eine locker wachsende *Pelargonium*-Sorte mit relativ kleinen Blättern von frischer grüner Farbe. Sie ist gut lebensfähig, wenig empfindlich bzw. vegetativ leicht vermehrbar und wächst kontinuierlich das ganze Jahr hindurch (POHLHEIM 1977). Die Pflanzen sind sehr reichblütig und ihre Blüten relativ klein, rot und ungefüllt (DE GRAF 1968) und werden als Zierpflanzen kultiviert. Es gelang bisher nicht, einen Hinweis zur Entstehung der Sorte 'Kleiner Liebling' zu finden. Jedoch deutet der deutsche Sortenname auf eine Entstehung im deutschen Sprachraum hin.

CHITTENDEN (1926; 1927) erwähnte die Sorte 'Kleiner Liebling' das erste Mal im Zusammenhang mit wissenschaftlichen Untersuchungen über Variegationen von Blütenmustern. DAKER (1966; 1967) wies bei der Sorte 'Kleiner Liebling' an der mitotischen Phase von Zellen der Wurzel- und Sprossspitzen mehrerer Herkünfte nach, dass die Sorte haploid mit 9 Chromosomen in den somatischen Zellen ist. Gleichzeitig ist das eine der nachgewiesenen Chromosomengrundzahlen der Gattung *Pelargonium*. Die haploide Sorte 'Kleiner Liebling' ist steril. Diese Sterilität beruht nicht ausschließlich auf der vorliegenden Haploidie. Offenbar haben sich in der Klonesgeschichte genetisch bedingte Meiosestörungen angereichert und verhindern die Pollenbildung (DAKER 1967). Auf Grund der vorliegenden Sterilität sind Selbstungen oder Kreuzungen mit dieser Sorte auch nach Diploidisierung nicht möglich. Eine genetische Analyse dieser Variante konnte deshalb bis in die heutige Zeit nicht durchgeführt werden. Seit ihrer Entstehung wurde diese Sorte ausschließlich vegetativ vermehrt.

Der Sprossscheitel von *Pelargonium zonale* besteht wie bei den meisten Dikotylen aus drei Schichten (BAUR 1909; BERGANN 1967; TILNEY-BASSETT 1986). Die Sorte 'Kleiner Liebling' besitzt drei genetisch grüne haploide Zellschichten im Sprossscheitel. Bei der Blattentwicklung wird aus den Abkömmlingen der Zellen der L1 die Epidermis gebildet, aus Abkömmlingen der Zellen von L2 die Palisadenschicht, das untere Schwamm-parenchym, sowie Mesophyll des Blattrandes und aus Abkömmlingen der Zellen der L3

das restliche Innengewebe (VON GUTTENBERG 1960; LIEBAU 1988) sowie die Stecklingswurzeln.

Die haploide Sorte 'Kleiner Liebling' hat den Vorteil, dass nach Behandlung mit einem Mutagen rezessive Mutationen nicht durch dominante Allele bei der Merkmalausbildung kompensiert werden können (POHLHEIM 1978). Man kann unmittelbar verfolgen, wie sich die Abkömmlinge einer entsprechend mutierten Zelle in der weiteren Entwicklung verhalten. Somit ist die Sorte als Modellpflanze für Mutationsversuche gut geeignet.

Seit längerer Zeit wurden bei Mutagenitätstests vor allem niedere Organismen, tierische und menschliche Zellen eingesetzt. Um diese Lücke zu schließen, führte POHLHEIM (1978) an haploiden Pflanzen von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' ein umfangreiches Mutationsexperiment mit Bestrahlung und Chemikalien durch. Die Kloneltern 'Kleiner Liebling', die für die Untersuchungen zur Verfügung standen, erhielt Prof. BERGANN 1968 aus den Royal Botanic Gardens Kew (POHLHEIM 1978). Durch die mehrjährigen Arbeiten in Potsdam und Berlin (POHLHEIM *et al.* 1972; POHLHEIM & POHLHEIM 1974; POHLHEIM 1978; POHLHEIM & RÖSSEL 1989) steht hervorgegangen aus *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' eine umfangreiche Sammlung von heterohistischen Sprossvarianten für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung. In Abbildung 2 wird die Entstehung einiger Varianten dieser Sammlung, die für die vorliegende Arbeit eine Rolle spielen, schematisch dargestellt.

So entstanden an 'Kleiner Liebling' durch Chlorophylldefektmutation chimärische Laubblattmuster: Weißbrandmuster GWG (L1- und L3-bürtige Zellen sind grün, L2-bürtige Zellen weiß), Weißkernmuster GGW (L1- und L2-bürtige Zellen sind grün, L3-bürtige Zellen weiß). Chimärisch bedingte Blütenfarbmuster entstanden durch Anthocyandefektmutation: beispielsweise W*RR (L1-bürtige Zellen sind anthocyandefekt, L2-bürtige und L3-bürtige Zellen anthocyanintakt). Die letztgenannte Variante wurde als 'Rosa Liebling' (RL) benannt. Eine weitere Variante mit andersartiger Anthocyandefektmutation ohne Musterbildung wurde als 'Weißer Liebling' (WL) bezeichnet.

Neben Chlorophyll- und Anthocyandefektmutationen traten auch Veränderungen der Ploidiestufe im Sortiment von 'Kleiner Liebling' auf. Es liegen die Ploidiechimären DHH (L1-bürtige Zellen sind diploid, L2- und L3-bürtige Zellen haploid), HDD (haploid-diploid-diploid) und OTT (oktoploid-tetraploid-tetraploid) sowie die Homohistonten DDD (diploid) und TTT (tetraploid) vor.

Nach Bestrahlung von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' entstand der Klon 5/74 mit weißem Laubblattbinnenfeld. An Klon 5/74 trat ein Sport auf, der gekräuselte Blätter aber ebenfalls das weiße Binnenfeld hatte. Dieser Sport konnte als Klon etabliert werden und wurde als Klon 5/74/1 benannt. Daraus bildete sich eine Form mit völlig grünem Blatt aber nach wie vor gekräuselten Epidermis, die als Klon aufgebaut werden konnte und mit 5/74/2 bezeichnet wurde (Abb. 2). LIEBAU (1988) fand heraus, dass die Epidermis von Klon 5/74/2 in ihren Zellgrößen weit über dem Maß der ursprünglich haploiden Zellgröße liegt. Es wurde angenommen, dass es sich bei Klon 5/74/2 um eine Cytochimäre folgender Konstitution handelt: polyploid, haploid, haploid. Jedoch wurden bei histologischen Untersuchungen am Sprossscheitel haploide Zellen in L1 festgestellt. Daraus wurde geschlossen, dass die Polyploidisierung der Epidermiszellen von Klon 5/74/2 nicht schon im Sprossscheitel, sondern erst bei der Blattentwicklung beginnt (LIEBAU, 1988). Auffallend war dabei, dass die Vergrößerung der Zellen der Epidermis nicht einheitlich ist, wie es von einer normalen Ploidiemutation (auch bei *Pelargonium zonale*) zu erwarten ist. Das heißt, dass möglicherweise somatische Variabilität in diesem Zellklon auftritt.

Ziel der Arbeit ist es, dies vermutete somatische Variabilität in der Epidermis von Klon 5/74/2 näher zu charakterisieren. Ferner ist festzustellen, ob es sich bei 5/74/2 um eine Ploidiechimäre handelt und ob sie sich z. B. über die *in vitro*-Kultur entmischen lässt.

Sind einzelne Sprossscheitelschichten unterschiedlich und wenn möglich mehrfach markiert, kann man die daraus entstehenden Gewebe den Schichten relativ einfach zuordnen. Entstehen durch spontane oder induzierte Entmischung Homohistonten, kann man auch diese aufgrund ihrer Merkmale dem Genotyp einer entsprechenden Sprossscheitelschicht der ursprünglichen Chimäre zuweisen.

An Klonen mit markierten Geweben (in der vorliegenden Arbeit wurden die Klone 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR und 'Mrs. Pollock' GWG und GGW genutzt) können Untersuchungen zur Regeneration der kompetenten Zellschichten in der *in vitro*-Kultur durchgeführt werden, da sich die Regenerate eindeutig den Geweben des Ausgangsexplantates zuordnen lassen. Bisher wurde in der Literatur beschrieben (CASSELS & MINAS 1983), dass *Pelargonium zonale* hauptsächlich aus subepidermalem Gewebe regeneriert. Sind L1-, L2- und L3-bürtige Gewebe genetisch verschieden, lässt sich der Regenerationsort bestimmen. Bei der Nutzung von ploidie-markierten Chimären können allerdings Schwierigkeiten der Zuordnung auftreten, da in der *in vitro*-Kultur

Polyploidisierung von Zellen auftreten kann (BENNICI 1974). Auf die Problematik der *in vitro*-Kultur bei *Pelargonium* als solches wird im Kapitel 1.3 eingegangen.

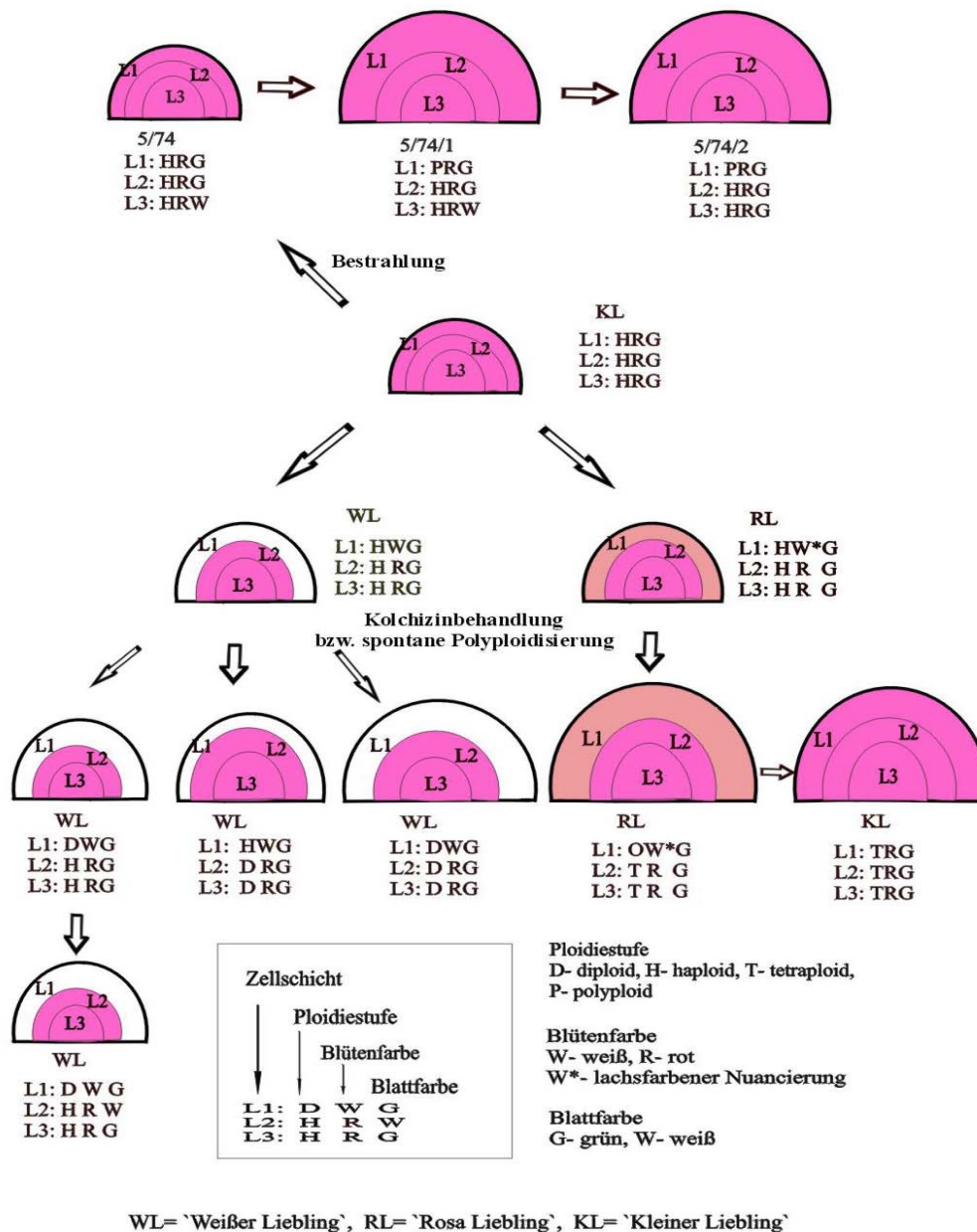


Abb. 2: Übersicht über die Entwicklung verschiedener Klone aus *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' (nach POHLHEIM 1978; LIEBAU 1988; RÖSSEL 1990; SPÄTH 2000).

1.3 *In vitro*-Kultur bei *Pelargonium zonale*

Die *in vitro*-Kultur ist eine Methode, mit der isolierte Pflanzenteile (Explantate) außerhalb des intakten pflanzlichen Organismus auf oder in einem geeigneten Nährmedium kultiviert werden. Das Medium übernimmt dabei die Funktion der ursprünglich in der Pflanze benachbart liegenden Zellen, Gewebe und Leitbündel. Dabei kann man die Bedingungen

des Wachstums optimieren, die Generationsdauer verkürzen und die Arbeitsleistung erhöhen. Für eine Primär-Kalluskultur eignet sich am besten Gewebe mit einem hohen Anteil parenchymatischer und /oder meristematischer Zellen (NEUMANN 1995).

Für *Pelargonium* wurden *in vitro*-Kulturverfahren mit Geweben von jüngeren Pflanzen (meistens Sämlingen) schon vielfach beschrieben (BENNICI *et al.* 1968; BENNICI 1974; KAMEYA 1975; MARSOLAIS *et al.* 1991; CASSELLS *et al.* 1995; HUTCHINSON & SAXENA 1996b; KRISHNARAJ *et al.* 1997; MURTHY *et al.* 1999; MITHILA *et al.* 2001). Jedoch gibt es genotypabhängige Probleme, adulte Gewebe von *Pelargonium zonale* in der *in vitro*-Kultur zu regenerieren, da adulte Gewebe phenolähnliche metabolische Substanzen (Hauptkomponenten sind Quercetin, Proanthocyanidine und Ellagitannine) enthalten. Sie können mit mehreren Chemikalien des Nährmediums eine schwarze, toxische Phenolverbindungen bilden und diese in das Medium ausscheiden (ANONYMOUS 1978; PIERIK 1989; BAUER 1993; RASAI *et al.* 1995). Diese Phenolverbindungen schädigen die isolierten Gewebe und verhindern die Kallusinduktion. Es gab Versuche mit verschiedenen Methoden, solche Ausscheidungen zu beseitigen (BAJAJ 1991; JORDAN *et al.* 1991; BRIDG 1993). Dabei ist das wiederholte Umsetzen der Explantate einfach anzuwenden, jedoch ist es sehr zeit- und materialaufwendig (NEUMANN 1995). Deswegen erweist es sich als notwendig, Verfahren zur Optimierung der Kulturbedingungen zu entwickeln, um hohe Regenerationsraten zuverlässig erzielen zu können.

Die meistens benutzten Wachstumsregulatoren zur Induktion von Kallus und zur Regeneration aus den Geweben von *Pelargonium zonale* sind IAA, NAA, 2,4-D und BAP sowie TDZ (BENNICI 1990; MARSOLAIS *et al.* 1991; MURTHY *et al.* 1996; MITHILA *et al.* 2001). BENNICI (1974) regenerierte Adventivpflanzen aus Petalgeweben von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' auf einem MS-Medium mit NAA und Kinetin. Mehrere Autoren berichteten über die Induktion von somatischer Embryogenese durch TDZ bei *Pelargonium zonale* (VISSER *et al.* 1992; HUTCHINSON & SAXENA 1996a; MURTHY *et al.* 1996; HUTCHINSON *et al.* 1997; MITHILA *et al.* 2001). Aber die Wirkung von TDZ auf Explantate adulter Pflanzen wurde bisher nur an *Pelargonium peltatum*-Hybriden (ROBICHON 1997) und in wenigen Fällen an *Pelargonium zonale* untersucht (CROKE & CASSELLS 1997), wobei in beiden Berichten keine quantitativen Ergebnisse zur Regeneration dargestellt wurden (HÄNSCH 2001). Ursprünglich wurde TDZ als eine Substanz zum Entblättern bei Baumwolle benutzt. MOK *et al.* (1982) fanden die Cytokininaktivität von TDZ. VISSER *et al.* (1992) beobachteten, dass IAA und BAP im

Gegensatz zu TDZ keine Wirkung auf die Kallusinduktion vom *Pelargonium*-Gewebe zeigen, wenn sie allein angewandt werden. MITHILA et al. (2003) beobachteten, dass eine niedrige Konzentration von TDZ die Sprossorgane induziert, während eine hohe Konzentration somatische Embryogenese auslöst. Der Mechanismus der Funktion von TDZ ist noch unklar.

Daher ist es ein weiteres Ziel der Arbeit, verbesserte Protokolle für die *in vitro*-Regeneration von Pflanzen aus Kallus bei *Pelargonium zonale* zu entwickeln. Der Effekt verschiedener Maßnahmen gegen die Phenolbildung bzw. -akkumulation soll geprüft werden. Desweiteren wird der Einfluss unterschiedlicher Kombinationen von Wachstumsregulatoren auf die Kallusentwicklung getestet.

1.4 *Fragstellungen*

Anhand der Untersuchungen sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Wie verhalten sich die Zellen der L1-bürtigen Epidermis und wodurch entsteht die somatische Variabilität in der Epidermis des chimärischen Klons 5/74/2?
2. Welcher Zusammenhang besteht zwischen der somatischen Variabilität der Epidermis und dem Phänotyp (morphologische Besonderheit) von Klon 5/74/2?
3. Lassen sich Sprossvariation (Entmischung) zur L1- oder Innenkomponente von Klon 5/74/2 in den Scheiteln beobachten und welche Eigenschaften zeigen diese?
4. Können variierende Zellen der Epidermis von Klon 5/74/2 durch *in vitro*-Kultur getrennt und zu Homohistonten regeneriert werden?
5. Welche Zellen sind bei *Pelargonium zonale* kompetent für die Kallusinduktion und Regeneration?
6. Wie kann die Methode zur *in vitro*-Regeneration aus adulten Geweben von *Pelargonium zonale* verbessert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Die Ausgangspflanze des Untersuchungsmaterials war die Sorte 'Kleiner Liebling' von *Pelargonium zonale*. Hauptgegenstand dieser Untersuchung ist der Klon 5/74/2. Außerdem dienten die Ausgangssorte 'Kleiner Liebling' sowie der diploide Klon DDD von 'Weißer Liebling' und der tetraploide Klon TTT von 'Kleiner Liebling' bzw. verschiedene mehrfach markierte chimärische Klone (doppelt markierter Klon 'Weißer Liebling', HDD, WRR bzw. dreifach markierter Klon 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR) (Abb. 2) als Vergleichsmaterial. Weiterhin wurde die Sorte 'Mrs. Pollock' (Abb. 4) für *in vitro*-Kultur-Experimente eingesetzt.

Klon 5/74/2 wurde aus dem Sport 5/74/1 ausgelesen und gehört zu der Sportfamilie 5/74, die in einem Mutationsversuch mit Röntgenstrahlung aus der haploiden Sorte 'Kleiner Liebling' entstand (Abb. 2, oben rechts) (POHLHEIM 1978; LIEBAU 1988). Die Größe und der Habitus der Pflanzen von Sport 5/74 unterschieden sich nicht von 'Kleiner Liebling', alle drei Gewebeschichten waren haploid (LIEBAU 1988). Die Blätter der Pflanzen hatten ein helles Binnenfeld. Die Blätter des Sports 5/74/1 besaßen eine gekräuselte und stark behaarte Oberfläche und ebenfalls ein helles Binnenfeld. Wurzel-austriebe der Sports 5/74 und 5/74/1 waren weiß. Das heißt, dass die L3 beider Varianten chlorophylldefekt war. Leider sind die Pflanzen des Klons 5/74/1 inzwischen eingegangen und stehen für Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung.

Das Blatt von 'Kleiner Liebling' ist glatt und leicht behaart (Abb. 3A). Im Gegensatz dazu ist das Blatt von Klon 5/74/2 gekräuselt und stark behaart, jedoch im Unterschied zu Klon 5/74/1 völlig grün (KB) (Abb. 3B). LIEBAU (1988) vermutet, dass Klon 5/74/2 durch eine Verdopplung der grünen L2 mit gleichzeitiger Verdrängung der chlorophylldefekten L3 aus Klon 5/74/1 entstanden ist. Der Klon 5/74/2 ist nicht stabil. Bei vegetativer Vermehrungen durch Stecklinge *in vivo* entstehen nicht selten Sprosse mit neuer Blattform aus der ursprünglichen KB-Form von Klon 5/74/2: Die Blätter dieser Sprosse sind entweder gekräuselt ohne starke Behaarung (K), oder stark behaart ohne Kräuselung (B) oder glatt mit kurzen Haaren (N) wie 'Kleiner Liebling'. Abbildung 3C zeigt eine Pflanze von Klon 5/74/2 mit einem Spross mit nur behaarten Blättern (B) und mit einem typischen Spross mit gekräuselten und stark behaarten Blättern (KB). Die Stabilität des Sports aus Klon 5/74/2 wurde untersucht. Sprosse mit gekräuselten oder stark behaarten oder glatten und

kurzhaarigen Blättern wurden abgenommen und als Sports K, B und N weiter-kultiviert. Dabei sollte geprüft werden, ob an K- und B-Sports wiederum N-Sprosse auftreten und an N-Sprossen Rückschläge von Typ 5/74/2 entstehen.

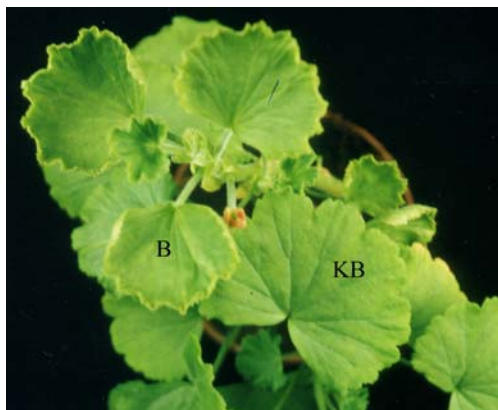
**A****B****C**

Abb. 3: Morphologie der Blätter des untersuchten Klons 5/74/2.

A. Normales Blatt von 'Kleiner Liebling', glatt und schwach behaart (N).

B. Typisches Blatt von Klon 5/74/2, gekräuselt und stark behaart (KB).

C. Spross mit behaarten Blättern (B) und Spross mit gekräuselten und stark behaarten Blättern (KB) an einer Pflanze des Klons 5/74/2.

Der dreifach markierte chimärische Klon 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR ist eine Cytochimäre und kombiniert Laub- und Blütenblattnuster (Abb. 2, unten links). Die Zellen der L1-bürtigen Epidermis sind diploid und die Zellen der L2- sowie L3-bürtigen Gewebe sind haploid. Darüber hinaus sind die Epidermis und die inneren Gewebe des Blattes grün, der Rand des Blattes (L2-bürtig) ist weiß. Die Blütenfarbe der Blüten ist weiß.

Der genutzte Klon 'Mrs. Pollock' hat ein Weißrand-Blattnuster (GWG) (Abb. 4A, B). Bei der mehrjährigen vegetativen Vermehrung durch Stecklinge entstanden auch Sprosse mit Weißkern-Blattnuster (GGW) oder völlig grünen Blättern (GGG) (Abb. 4C-H).

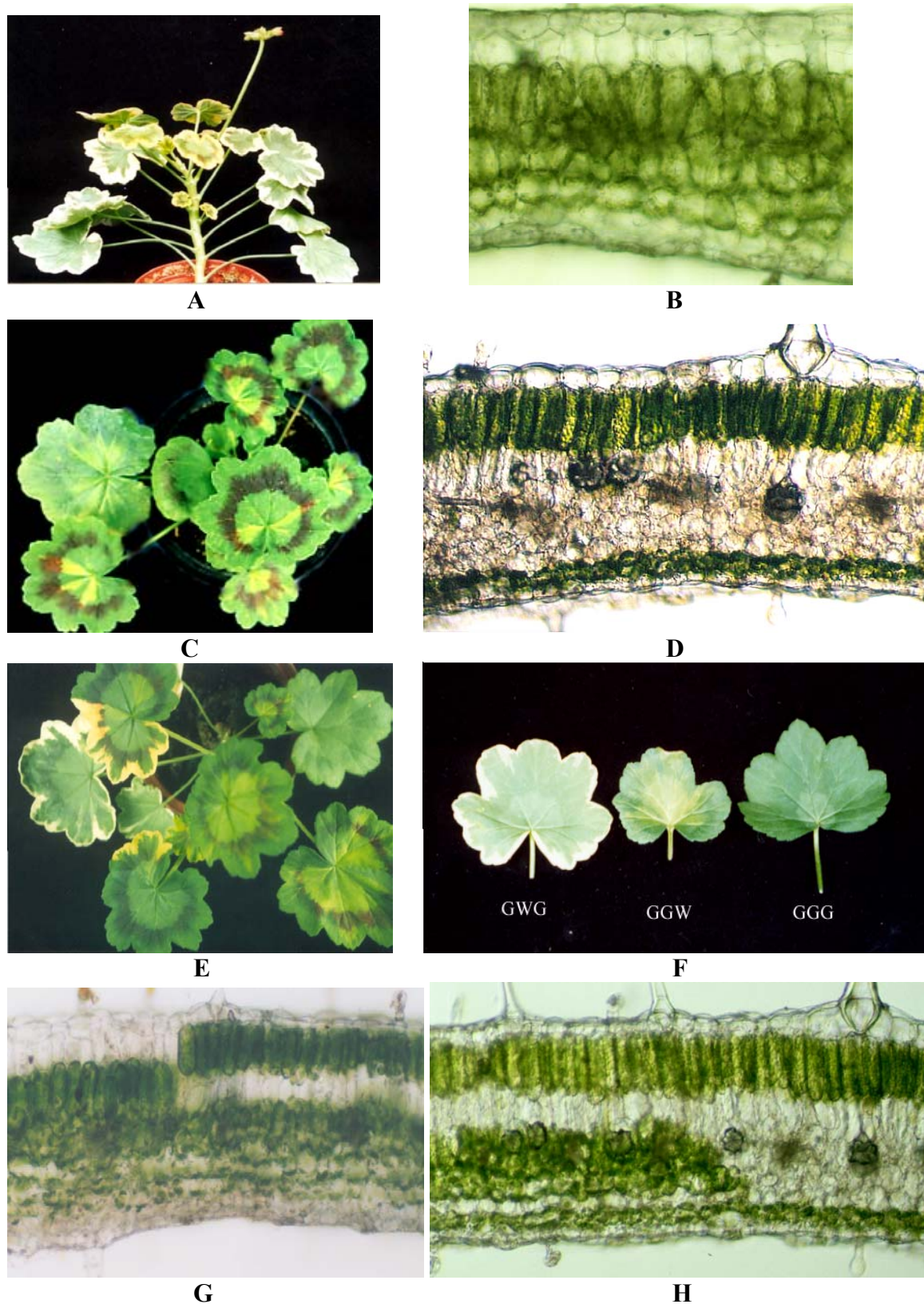


Abb. 4: Blattmuster und Blattvariation von 'Mrs. Pollock'. **A-B.** Blattmuster GWG und der Querschnitt im Binnenfeld; **C-D.** Blattmustervariante GGW und der Querschnitt im Binnenfeld; **E-F.** Blattmustervariation von GWG zu GGW und GGG; **G-H.** Querschnitt im Binnenfeld der Übergangszone von GWG zu GGW und im grünen Binnenfeld von GWG.

2.2 Untersuchungsverfahren

Zum Nachweis der Variabilität der Epidermiszellen von Klon 5/74/2 wurden die Stomatalängen in Frischpräparaten und die Zellgrößen von Sprossscheitellängsschnitten gemessen. Dazu wurden Epidermisabzüge und Kunststoffpräparate angefertigt. Weiterhin wurde die Chromosomenzahl der L1-, L2- und L3-bürtigen Gewebe untersucht. Alle Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus herangezogen.

2.2.1 Untersuchungen der Stomatagrößen

Zur Bestimmung der Stomatagrößen an Frischpräparaten wurde jeweils das 3. Laubblatt von vier Pflanzen des haploiden, und tetraploiden Klons der Sorte 'Kleiner Liebling', des diploiden Klons 'Weißer Liebling' sowie von Klon 5/74/2 abgenommen. Unter der Lupe wurde die untere Epidermis des Laubblattes vorsichtig abgezogen. Dann wurde die Epidermis direkt auf einen mit einem Wassertropfen vorbereiteten Objektträger aufgelegt. Nach Bedecken mit dem Deckglas wurden die Stomatalängen und die Stomatabreiten unter dem Mikroskop mit einem Messokular bestimmt. Der Faktor für die Ermittlung der wirklichen Größe der Zellen wurde unter Zuhilfenahme eines Objektmikrometers wie folgt errechnet:

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Anzahl der Objektmikrometerintervalle} \times \text{Intervallgröße}}{\text{Anzahl der Okularmikrometerintervalle}}$$

Dabei wurde auf eine bei jeder Messung gleiche Entnahmestelle am Laubblatt (Interkostalfeld) und eine ähnliche Konstitution der Pflanzen (Alter, Gesundheits- und Ernährungszustand, gleiche Position des untersuchten Laubblattes) geachtet (SCHWANITZ 1952). Die Erfassung von Messwerten der Stomata einer Pflanze und der Vergleich mit anderen Pflanzen bekannter Ploidiestufe in einer ausreichend großen Stichprobe gilt als sicheres Mittel, um zu einer relativen Aussage über die Ploidiestufe der ersten Scheitelschicht zu kommen. Jedoch ist die Zellgröße ein quantitatives Merkmal und es kann von Umweltfaktoren beeinflusst werden. Deswegen wurden die Daten statistisch abgesichert.

2.2.2 Untersuchung der Chromosomenzahl an Frischpräparaten

Direkte Chromosomenzählung ist die sicherste Methode zur Bestimmung der Ploidiestufe des Gewebes. Mindestens 10 Wurzel- und Sprossspitzen pro Klon wurden am frühen Mittag bei Sonnenschein gesammelt, da zu dieser Zeit schnelles Wachstum stattfindet und

die mitotische Aktivität am höchsten ist. Sie wurden sofort in 0,1 %iger Kolchizinlösung für 3 -20 h bei einer Temperatur von 4°C vorbehandelt, um die Chromosomen zu stauchen. Zur Fixierung wurden die Präparate in Fixierlösung (Verhältnis von 3:1; 96%iges Ethanol:100%ige Essigsäure) bei Zimmertemperatur für 24 h gegeben. Die fixierten Präparate lassen sich in 70%igem Ethanol aufbewahren. Die Präparate wurden in 1%iger Karminessigsäure für 24 h gefärbt und anschließend in Karminessigsäure gekocht bis sie weich waren. Danach wurden die Präparate gequetscht und mikroskopiert (Durchlichtmikroskope Jenaval-contrast und Laboval-2, Dokumentation der Ergebnisse mit dem mikrofotografischen Aufsetzkamerasystem mf-AKS).

2.2.3 *Herstellungen von Dauerpräparaten mit Kunststoff-Einbettung*

Zur Untersuchung der Ploidiestufen der verschiedenen Scheitelschichten wurden vom haploiden 'Kleinen Liebling', diploiden 'Weißen Liebling' sowie von Klon 5/74/2 mindestens 10 Präparate pro Klon in Kunststoff eingebettet. Weiterhin wurden histologische Schnitte von Laubblättern angefertigt.

❖ Einbettung mit Kunststoff

Von *Pelargonium* entnommene Sprossspitzen (sowie Laubblätter) wurden nach folgendem Verfahren für die Einbettung behandelt: Die Sprossspitzen wurden bei Sonnenschein je nach Temperatur zwischen 9-15 Uhr entnommen. Nach Entfernung der Hüllblätter der Sprossspitzen unter der Stereolupe wurden die Präparate sofort in 0,1%ige Kolchizinlösung für 3, 6, 20 Stunden bei 4 °C gegeben. Nach der Kolchizinbehandlung wurden sie in Fixierlösung (96%iges Ethanol : 99%iges Chloroform : 100%ige Essigsäure = 6:3:1) für 15 min mit Hilfe einer Vakuumpumpe entlüft und zur weiteren Fixierung 24 Stunden darin belassen. Eine Entwässerungsreihe mit 99%igem Ethylenglykolmonomethylether, 96%igem Ethanol, reinem n-Propanol und 99,5%igem n-Butanol für jeweils 24 Stunden bei Zimmertemperatur wurde angeschlossen.

Für die Einbettung wurden die Präparate in einer Polymer-Lösung I aus Technovit 7100 (GMA + Co-Katalysator XCl) und Härter I (Dibenzoylperoxid) bei Raumtemperatur 24 Stunden infiltriert. Anschließend wurden die Präparate in einem Gemisch aus Polymer-Lösung I mit Härter II (Dimethylsulfoxid) im Verhältnis 10:1 in Formen bei Zimmertemperatur 24 Stunden polymerisiert. Nach der Polymerisation wurden Trägerblöcke an den Formen befestigt.

Die eingebetteten Präparate wurden am Rotationsmikrotom RM 2155 der Firma LEICA in einer Dicke von 6-10 µm geschnitten. Alle Schnitte wurden auf mit Alkohol gesäuberten Objektträgern in einem Wassertropfen nacheinander in serienmäßigen Reihen aufgelegt. Vor der Trocknung der Objektträger auf der Heizplatte bei 60°C wurden die Objektträger mit Bleistift an der Seite numeriert, damit die Serienschnitte bei der Untersuchung nicht vertauscht wurden.

❖ Anfärbung der Dünnschnitte

Die Dünnschnitte von in Kunststoff eingebetteten Dauerpräparaten wurden in verschiedenen Farbstofflösungen angefärbt.

- Modifizierte Feulgen –Färbung

Für die modifizierte Feulgen-Färbung wurde Schiffs-Reagenz-Lösung (Firma, Merck) mit 1%iger Formalin-Essigsäure-Mischlösung (38%iges Formaldehyd: 100%ige Essigsäure = 1:1 V/V) versetzt. In dieser Lösung wurden die Dauerpräparate 15 bis 30 min gefärbt und anschließend mit Leitungswasser kurz gespült.

- Toluidinblau-Färbung (ROMEIS 1989)

60 ml 1 %ige Toluidinblau O –Wasserlösung (Firma Fluka) wurde mit 30 ml 2,5 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 10 ml 70 %igem Alkohol versetzt (pH-Wert 12). Je nach gewünschter Färbung wurden die Präparate 5 Sekunden bis 1 Minute in dieser Lösung belassen und im Anschluss daran gründlich mit Leitungswasser gewaschen.

- Hämatoxylin – Färbung (HT)

Die Dünnschnitte der Dauerpräparate wurden in 2 %iger Hämatoxylin-Lösung (Firma Merck) nach DELAFIELD (ROMEIS 1989) bei Raumtemperatur für 24 Stunden gefärbt. Danach wurden die angefärbten Präparatschnitte 15 bis 20 Minuten in Leitungswasser differenziert.

- Karmin-Essigsäure-Färbung

Die geschnittenen Dauerpräparate von Sprossspitzen auf dem Objektträger wurden in 1%iger Karmin-Essigsäure-Lösung für 10 min gefärbt.

❖ **Aufbewahrung und Untersuchung von Dauerpräparaten**

Alle Präparate mit gut gefärbten Schnitten wurden auf der Heizplatte bei 60°C getrocknet. Nach der Trocknung wurden sie mit DPX- Lösung (Dermic-Paraxylol, Firma Fluka) und mit einem Deckglas zugedeckt und im Dunkeln aufbewahrt. Um die Farbstoffe der Präparatschnitte nicht zu bleichen, muss eine Belichtung der Objekte vermieden werden.

2.2.4 *In vitro*-Kultur mit *Pelargonium zonale*

❖ **Genotypen der Ausgangspflanzen**

Somatisches Gewebe von Klon 5/74/2 und Gewebe des dreifach markierten chimärischen *Pelargonium zonale*-Klons 'Weißer Liebling', DHH, GWG sowie GWG- und GGW-Gewebe von 'Mrs. Pollock' wurden *in vitro* kultiviert, um Adventivpflanzen zu regenerieren. Gleichzeitig sollte die Kompetenz von Zellen im Gewebe zur Induktion von Kallus festgestellt werden.

❖ **Nährmedium**

Es wurde modifiziertes MS-Medium (MURASHIGE & SKOOG 1962) mit der halben Konzentration der Makrosalze und 30 g Saccharose verwendet (Tab. 1). Dann wurde die Vitaminlösung B5 (GAMBORG *et al.* 1968) zugegeben. Diesem Medium wurden verschiedene Wachstumsregulatoren und Substanzen zur Verminderung der Phenolakkumulation zugefügt (Tab. 2). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH oder HCl auf 5,8 reguliert.

Um Misserfolge durch Phenolverbindung zu vermeiden, wurden 12 physikalische oder chemische Varianten von PIERIK (1989) vorgeschlagen. Jedoch liegen keine publizierten detaillierten Protokolle vor. Als Zusatz der Nährmedien zur Verminderung der Bildung von Phenolakkumulation wurden Sand, Papierbrücken, adsorbierende Stoffe wie Aktivkohle, PVP und Perlit sowie Antioxidationssubstanzen (Ascorbinsäure 6,5 mg/l und Glutamin 200 mg/l) eingesetzt (Tab. 2). Alle Varianten (außer Sand und Papier) wurden als Festmedium (0,8 oder 0,4% Agar-Agar) sowie als Flüssigmedium angesetzt. Nach dem Auflösen des Agars durch Kochen wurde die entsprechende Substanz zugegeben. Die Kultur erfolgte in Wulstrand-Glasröhrchen, die mit 10 ml oder in Erlenmeyerkolben, die mit 20 ml der Nährlösung gefüllt wurden. Perlit wurde in gleichem Volumen mit Flüssigmedium

aufgefüllt. Die mit Nährmedium gefüllten und mit Aluminiumfolie verschlossenen Kulturgefäße wurden im Autoklav 20 Minuten bei 121°C und 1,2 at sterilisiert.

Tab. 1: Bestandteile des für die Gewebekultur verwendeten Nährmediums

Makronährstoffe	mg/l	Mikronährstoffe	mg/l
KNO ₃	950,0	MnSO ₄ *H ₂ O	16,9
NH ₄ NO ₃	825,0	H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ *7H ₂ O	185,0	ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6
CaCl ₂ *2H ₂ O	220,0	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25
KH ₂ PO ₄	85,0	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
Fe-SO ₄ *7H ₂ O	27,8	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025
Na ₂ -EDTA	37,8	KJ	0,83
Organische Bestandteile			
Glycin	20,0		
Myo-Inosit	10,0		
Zucker	30000,0		
Vitamine			
Nicotinsäure	5,0		
Pyridoxin	1,0		
Thiamin	1,0		

Tab. 2: Zusätze zu den Kulturmedien

<u>1. Wachstumsregulator</u>		
A. IAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l	B. IBA 0,5 mg/l+BAP 2 mg/l	C. 2,4-D 3 mg/l + BAP 2 mg/l
D. TDZ 5 mg/l	E. TDZ 2,2 mg/l	F. TDZ 0,8 mg/l
<u>2. Substanzen zur Verminderung der Phenolakkumulation</u>		
I. PVP 500 mg/l	II. Aktivkohle 0,5%	III. Sand
IV. Perlit + PVP	V. Ascorbinsäure 6,5 mg/l + Glutamin 200 mg/l	VI. Papierbrücke

❖ Explantatgewinnung

Als Explantate dienten Internodiensegmente (ca. 0,5 cm), Blattspreiten (ca. 0,7 cm x 0,7 cm), Sprossspitzen (ca. 1 cm), und Blattstiele ohne Blattgrund, um den Nebenvegetations-

kegel auszuschließen. Die von den Pflanzen entnommenen Blätter, Stängel und Blattstiele wurden mit Leitungswasser gründlich gewaschen. Das Pflanzenmaterial wurde zuerst in 70 %igem Ethanol 1 min geschwenkt und dann mit Aqua dest. gespült. Je nach Explantatgröße wurden die Explantate 4 bis 6 Minuten in 0,25 %iger Wofasteril-Lösung (Peressigsäure, Firma, Kasla) mit 2-3 Tropfen/100 ml Tween 20 unter Schütteln sterilisiert und anschließend dreimal mit autoklaviertem Aqua dest. gespült. Alle *in vitro*-Kultur Arbeiten wurden an einer Laminarbox durchgeführt, die Instrumente wurden mit dem Tischsterilisator HBS 920 electronic der Firma AGROGEN-Promotion bei 240°C sterilisiert.

❖ Kultivierung der Explantate

Jedes Röhrchen enthielt 1 oder 2 Explantate und jeder Kolben enthielt 4 Explantate. Die *in vitro*-Kulturen wurden im Kulturraum bei Temperaturen von 22-26°C zunächst vier Tage in Dunkelheit, anschließend bei einer Photoperiode von 12 h Hell-/ 12 h Dunkelphase kultiviert. Leuchtstoffröhren mit Tageslichtqualität dienten als Lichtquelle. In der ersten Kulturphase wurden die Explantate 4 Tage in flüssigem Medium oder auf Perlit-Medium kultiviert, um das Phenol auszuwaschen bzw. zu verdünnen. Dann wurden sie auf gleiches, mit Agar verfestigtes Medium überführt. Nach Sprossbildung wurden sie auf hormonfreies Medium umgesetzt, um die Wurzeln zu induzieren. Nach der Bewurzelung wurden die Adventivpflanzen im Gewächshaus weiterkultiviert.

2.2.5 Bilddokumentation und statistische Auswertung der Daten

Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten an den Durchlichtmikroskopen JENVAL-contrast und LABOVAL-2, die Dokumentationen der Ergebnisse mit dem mikrofotografischen Aufsetzkamerasystem mf-AKS und Kleinbildfilmen der Marke Agfa. Fotoaufnahmen der Pflanzen bzw. Pflanzenteile entstanden mit Apparaten der Marke Practica unter Verwendung von Kleinbildfilmen der Marken Agfa und Kodak.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 10 für Windows (SPSS INC., 2000). Die Daten wurden mit dem K-S-Test (KOLMOGOROV-SMIRNOV) auf Normalverteilung geprüft. Lag Normalverteilung vor, wurden die Ergebnisse mit einer Varianzanalyse (ANOVA) und mit dem Tukey-Test zur Mittelwertvergleich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ geprüft. Lag keine Normalverteilung vor, wurden der H-Test (KRUSKAL-WALLIS) und der Nemenyi-Test angewandt (KÖHLER *et al.* 1992).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Zellgrößen zur Ploidiestufenbestimmung verschiedener Klone von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling'

3.1.1 Untersuchung der Epidermiszellgrößen in Laubblattquerschnitten

Die Querschnitte von in Kunststoff eingebetteten Laubblättern zeigten, dass die Epidermiszellgrößen des homohistisch haploiden und des homohistisch diploiden Klons relativ regelmäßig waren. Dagegen sind die Epidermiszellgrößen von Klon 5/74/2 unregelmäßig, wobei einzelne große Zellen deutlich aus der Epidermisoberfläche herausragen (Abb. 5).

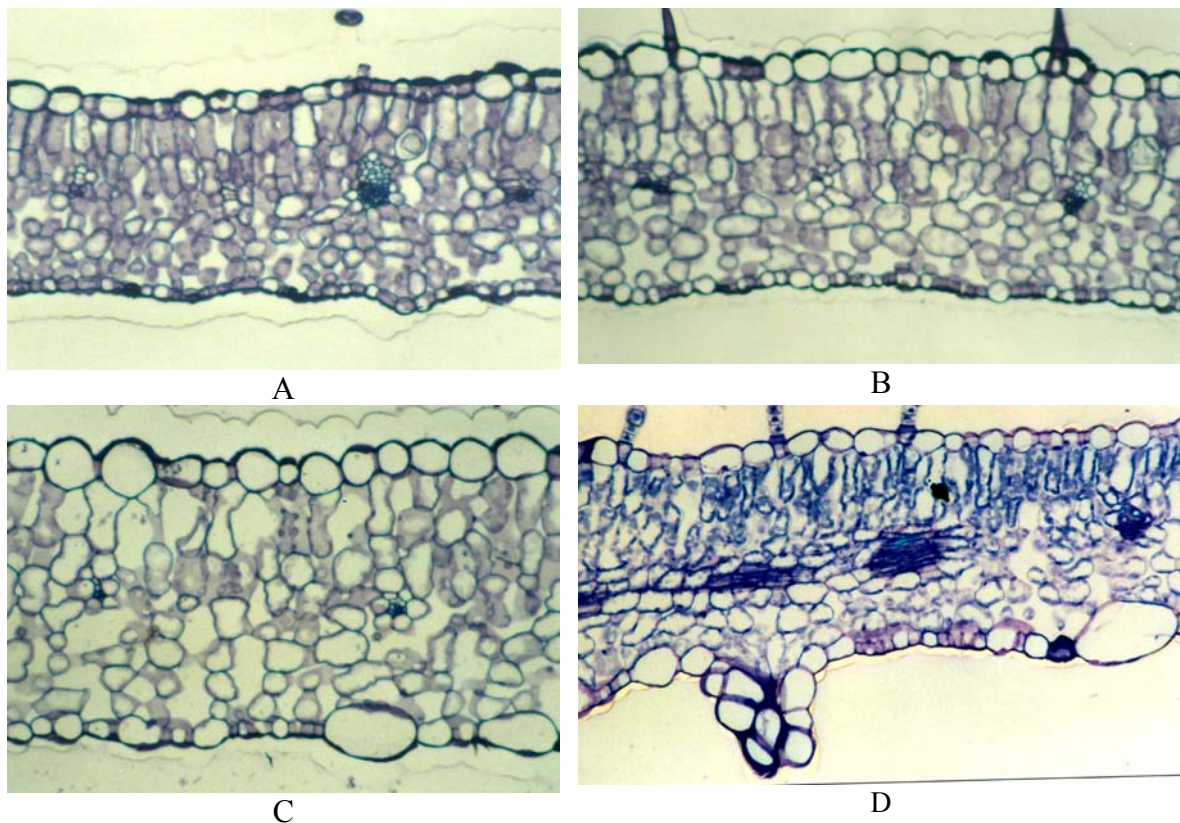


Abb. 5: Querschnitt durch in Kunststoff eingebettete ausgewachsene Laubblätter von verschiedenen Klonen aus *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling'. **A.** Querschnitt eines haploiden Blattes von 'Kleiner Liebling', **B.** Querschnitt eines diploiden Blattes von 'Weißer Liebling', **C.** Querschnitt von Klon 5/74/2, sowohl auf der Blattober- als auch Blattunterseite treten in der Epidermis stark vergrößerte Zellen in Erscheinung, die zum Teil aus der Epidermisoberfläche herausragen. **D.** Querschnitt von einem Sektorblatt (N/B) von Klon 5/74/2. Davon sind die oberen Epidermiszellen diploid und die unteren Epidermiszellen zeigen unterschiedliche Größe.

Je 100 Zellen der oberen Epidermis der in Kunststoff eingebetteten Laubblattquerschnitte des 3. vollständig entfalten Laubblattes wurden in Höhe und Breite vermessen. Dabei waren die oberen Epidermiszellen des diploiden Klons signifikant breiter und höher als die des haploiden (Tab. 3). Die Epidermiszellen von Klon 5/74/2 wiesen auffällig unregel-

mäßige Größen auf. Die Mittelwerte der Epidermiszelllängen und -breiten bei Klon 5/74/2 unterschieden sich signifikant von den für haploide und diploide Klone ermittelten Werten. Die Streubreiten variierten bei Klon 5/74/2 dreimal stärker als bei den anderen beiden Klonen.

Tab. 3: Epidermiszellgröße von Laubblattschnitten bei verschiedenen Klonen (Mittelwert \pm Standardabweichung (SD), jede Variante n = 100)

Klon	Zellbreiten (μm)		Zellhöhe (μm)	
	Mittelwert \pm SD	Streubreiten	Mittelwert \pm SD	Streubreiten
haploid	22,3 ^a \pm 6,3	11,0- 47,0	19,7 ^a \pm 2,6	14,0- 27,0
diploid	31,1 ^b \pm 6,8	16,0- 49,0	25,4 ^b \pm 4,5	17,0- 36,0
5/74/2	56,1 ^c \pm 26,6	16,0-156,0	48,0 ^c \pm 15,5	20,0-100,0

Mittelwerte, die in einer Spalte mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, H-Test und Nemenyi-Test).

3.1.2 Stomatagrößen in verschiedenen Klonen aus 'Kleiner Liebling'

Um eine indirekte Aussage über den Ploidiegrad der Epidermiszellen des Klons 5/74/2 zu erhalten, wurden zunächst Stomata eines haploiden, eines diploiden und eines tetraploiden Klons von 'Kleiner Liebling' gemessen und mit den entsprechenden Messwerten von 5/74/2 verglichen. Länge und Breite der Stomata nimmt von der haploiden über die diploide zur tetraploiden Stufe zu (Abb.6A-C, Tab. 4). Die Stomata von Klon 5/74/2 sind größer als die des tetraploiden Klons (Abb. 6D). Die Größe der Stomata von 5/74/2 ist aber nicht so einheitlich (Abb.6E), wie sie von einer normalen Ploidiestufe (haploid, diploid, tetraploid) bekannt ist. Außerdem wurden Stomataszwillinge und Stomatamehrlinge bei 5/74/2 beobachtet (Abb. 6F).

Die Mittelwerte der Stomatabreiten und -längen der 3. vollständig entfalteten Laubblätter nehmen von haploid über diploid zu tetraploid zu und steigen signifikant mit der Ploidiestufe an (Tab.4). Die Distanz der Mittelwerte der Stomatalängen zwischen dem haploiden Klon und dem diploiden Klon beträgt 7 μm und zwischen dem diploiden und

dem tetraploiden 6,5 μm . Das heißt, dass eine Ploidieverdoppelung beim *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' in einer Stomataverlängerung von ca. 6,8 μm führt.

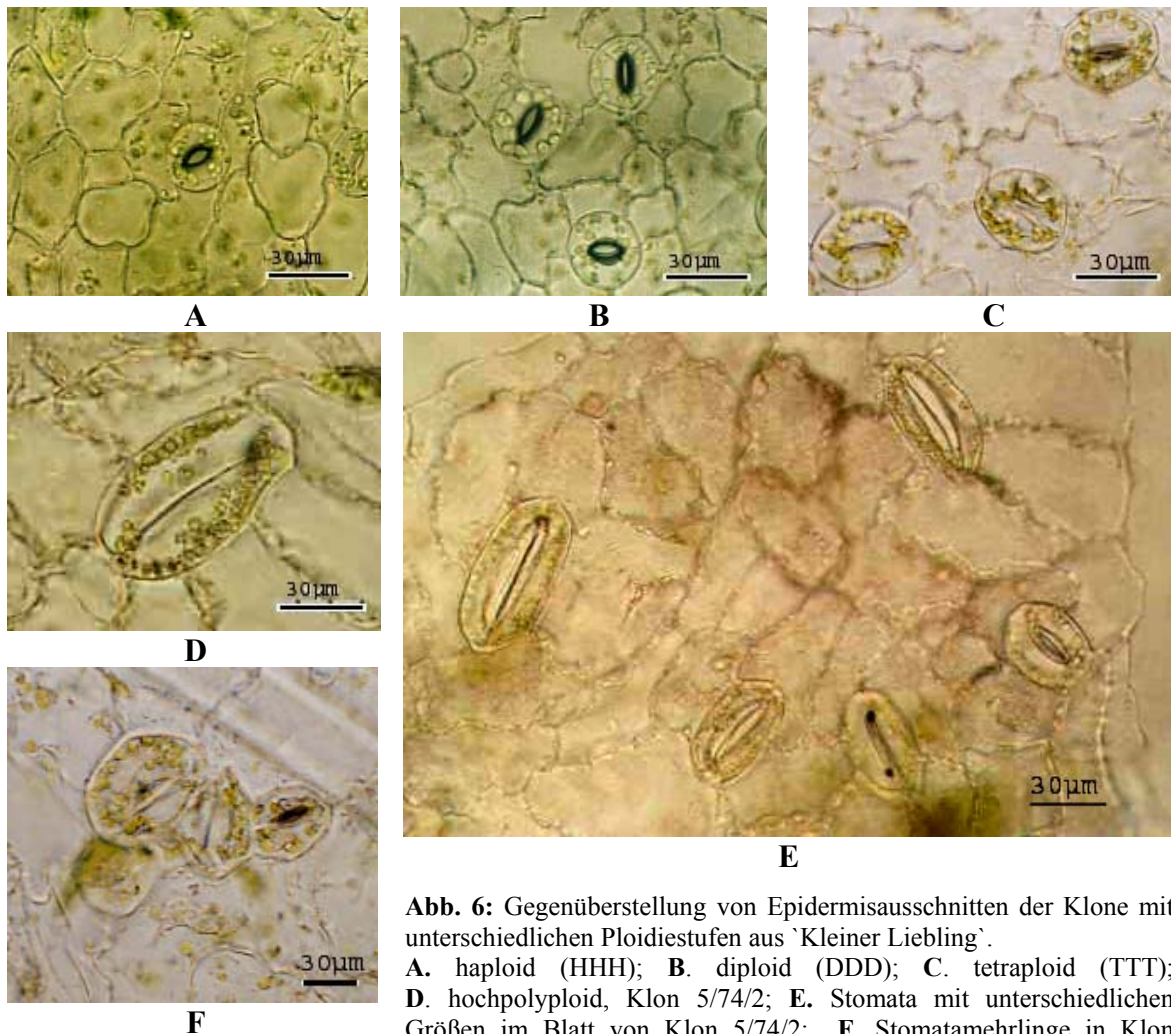


Abb. 6: Gegenüberstellung von Epidermisausschnitten der Klone mit unterschiedlichen Ploidiestufen aus 'Kleiner Liebling'.
A. haploid (HHH); **B.** diploid (DDD); **C.** tetraploid (TTT); **D.** hochpolyploid, Klon 5/74/2; **E.** Stomata mit unterschiedlichen Größen im Blatt von Klon 5/74/2; **F.** Stomatamehrlinge in Klon 5/74/2.

Die Stomatabreite nimmt jedoch nicht so stark zu wie die Stomatalänge. Die Differenz der Stomatabreiten zwischen dem haploiden Klon und dem diploiden Klon beträgt 5,1 μm , und zwischen dem diploiden und dem tetraploiden 3,0 μm . Der Quotient von Stomatalänge zu Stomatabreite nahm unregelmäßig mit der Steigerung der Ploidiestufe zu. Somit hat die Stomatabreite weniger Aussagekraft als die Stomatalänge bei der Abschätzung der Ploidiestufe. Deshalb wurde später nur die Stomatalänge als Parameter zur Analyse der Ploidiestufen benutzt.

Zwar kommen im Blatt der KB-Sprosse einige Inseln mit größeren oder kleineren Stomata vor, aber es ist keine Gesetzmäßigkeit der Anordnung dieser Inseln zu beobachten. Die Stomata von Klon 5/74/2 waren im Mittelwert sehr viel länger als bei dem tetraploiden

Klon (Tab. 4) und die Spannweite zwischen Minimum und Maximum der Stomatalängen war 3 mal größer. Die Häufigkeitsdiagramme der Stomatalängen zeigten, dass jeder der drei definierten Ploidieklone (haploid, diploid, tetraploid) von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' bzw. 'Weißer Liebling' nur einen Gipfel bildete (Abb. 7). Die statistische Überprüfung der Messwerte zeigt beim K-S-Test Normalverteilung an. Das bedeutet, die Stomatalängen der untersuchten Blätter gehörten zu jeweils nur einer Ploidiestufe. Die Überlappungen der Stomatalängen zwischen benachbarten Ploidiestufen bedeutet, dass die Messung einer zu kleinen Zellanzahl zu unsicheren Aussagen führen kann. Eine statistische Prüfung ist notwendig.

Tab. 4: Länge und Breite der Stomata bei verschiedenen Klonen aus 'Kleiner Liebling' (Mittelwert \pm Standardabweichung (SD), jede Variante n = 200)

Klon	Länge in μm		Breite in μm		Quotient = Länge/ Breite
	Mittelwert \pm SD	Streubreiten	Mittelwert \pm SD	Streubreiten	
haploid	22,0 ^a \pm 1,9	17,0-27,0	19,4 ^a \pm 2,1	15,0-25,0	1,134
diploid	29,0 ^b \pm 2,6	24,0-34,0	24,5 ^b \pm 2,5	22,0-32,0	1,184
tetraploid	35,5 ^c \pm 2,4	29,0-42,0	27,5 ^c \pm 2,3	23,0-35,0	1,291
5/74/2	52,3 ^d \pm 9,1	34,0-77,0	35,1 ^d \pm 5,2	25,0-47,0	1,490

Mittelwerte, die in einer Spalte mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, H-Test und Nemenyi-Test).

Das Häufigkeitsdiagramm der Stomatalängen von Klon 5/74/2 zeigt eine fünfgipflige Verteilung (Abb. 7) und weicht von den Häufigkeitsverteilungen der Klone mit bekannter Ploidiestufe von 'Kleiner Liebling' ab. Hier handelte es sich nicht um eine Normalverteilung, sondern um eine multimodale Verteilung.

Die fünf Gipfel im Häufigkeitsdiagramm der Stomatalänge des 3. Blattes von Klon 5/74/2 befinden sich bei 39, 47, 55, 63 und 69 μm . Die Unterschiede der benachbarten Gipfel der multimodalen Stomatalängenverteilung waren ca. 7,5 μm , also ungefähr so groß wie die durchschnittliche Steigung zwischen zwei benachbarten Ploidieverdopplungen in Vergleichsklonen von 'Kleiner Liebling', die bei 6,8 μm lag. Die Untergrenze der Stomatalängen von Klon 5/74/2 lag bei 35 μm , was offensichtlich dem Bereich und Mittelwert des

tetraploiden Klons entspricht.

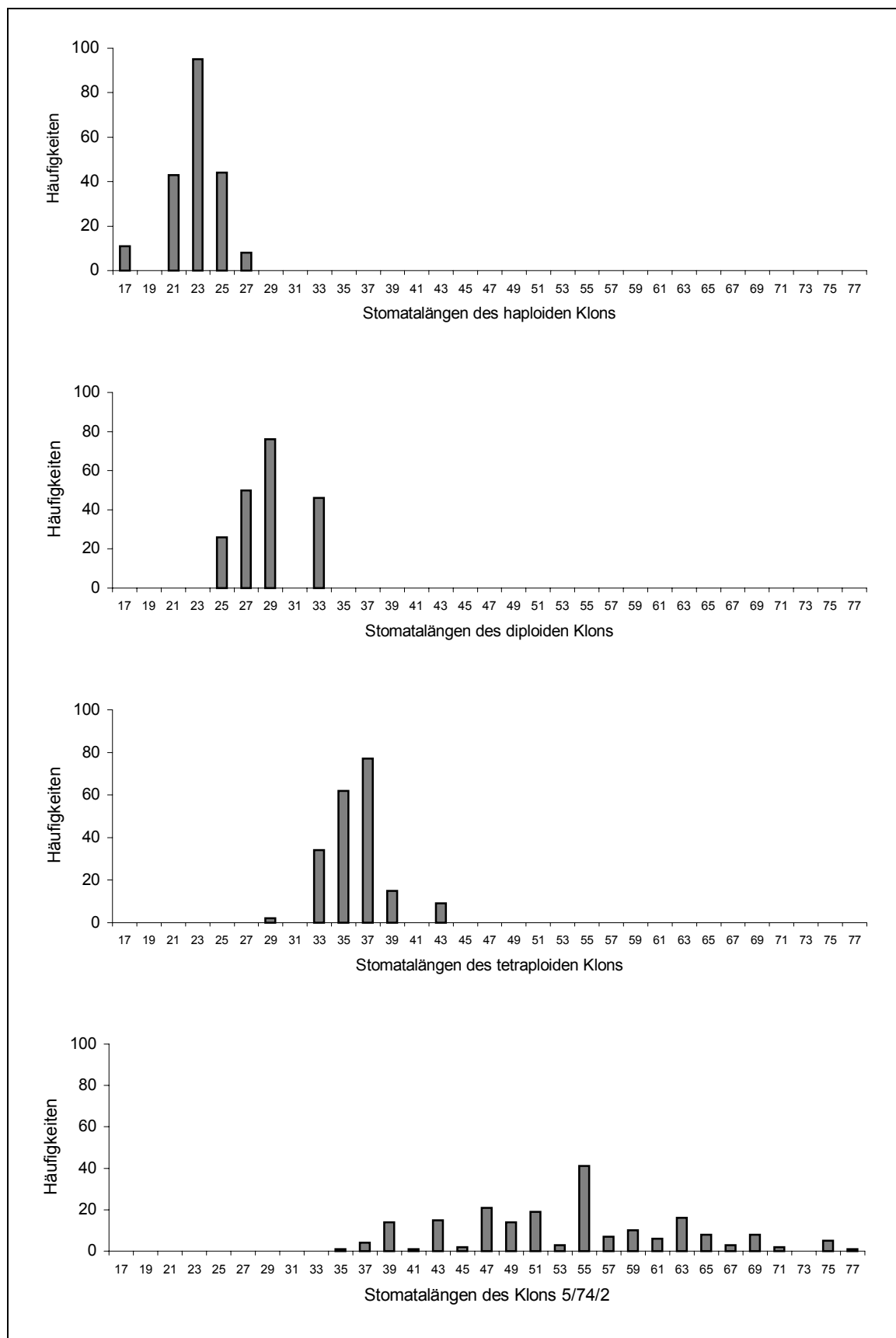


Abb. 7: Gegenüberstellung der Häufigkeitsdiagramme (Anzahl von Stomata) der Stomatalängen (in μm) verschiedener Klone aus 'Kleiner Liebling' (n=200).

Nach RISLER (1961) gehören alle Werte, die sich um einen Gipfel gruppieren, im wesentlichen einer Ploidiestufe an. Somit lässt sich anhand der Anzahl der Gipfel die Anzahl der unterschiedlichen Ploidiestufen ableiten und schlussfolgern, dass es sich bei der Epidermis von Klon 5/74/2 offensichtlich um ein Gewebe mit unterschiedlichen Ploidiestufen handelt. So kann man annehmen, dass die möglichen Ploidiestufen der Epidermiszellen des 3. Blattes bei den untersuchten Pflanzen von Klon 5/74/2 4, 8, 16, 32 und 64 sind.

3.1.3 Das Verhältnis von Stomatalängen zu Ploidiestufen unterschiedlicher Klone aus 'Kleiner Liebling'

Das Verhältnis der Mittelwerte der Stomatalänge zwischen haploidem und diploidem Klon in *Pelargonium zonale* war nicht wie das Ploidiestufenverhältnis 1:2, sondern ca. 1: 1,35 (Tab.5), zwischen haploid und tetraploid war es durchschnittlich 1:1,65. Das Verhältnis zwischen diploidem und tetraploidem Klon betrug ca. 1:1,22, war also kleiner als das Verhältnis zwischen haploidem und diploidem Klon. Das heißt, dass das Verhältnis des Mittelwertes der Stomatalänge aufeinander folgender Ploidiestufen nicht linear wie das Verhältnis der Ploidiestufen der Zellen anstieg, sondern mit Steigerung der aufeinander folgenden Ploidiestufen abnahm.

Die Regression zwischen Stomatalänge und Ploidiestufe der Epidermiszellen wurde berechnet. Die Analyse offenbarte, dass der Zusammenhang zwischen den Stomatalängen und den Ploidiestufen bei den drei untersuchten Vergleichsklonen sehr eng war. Diese Korrelation betrug 0,90. Das heißt, mit steigender Ploidiestufe erhöhten sich die Mittelwerte der Stomatalängen. Dabei betrug das Bestimmtheitsmaß der Korrelation zwischen Ploidiestufen und Stomatalänge 0,80. Das bedeutet, über 80% der Variabilität der Stomatalänge unter Voraussetzung einer linearen Abhängigkeit kann durch die Variabilität der Ploidiestufen erklärt werden.

Die Regression war bei $\alpha = 0,05$ signifikant. Deswegen kann man durch die Ermittlung der Stomatalänge die Ploidiestufen der Epidermiszellen der Klone von *Pelargonium zonale* indirekt bestimmen. Somit lassen sich die Stomata- und Epidermiszellgröße für die Ploidiebestimmung der ersten Sprossscheitelschicht nutzen.

Tab. 5: Quotienten der Mittelwerte der Stomatalänge und deren Ploidiestufe in verschiedenen homohistischen Klonen aus *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling'

Ploidiestufe	diploid	Tetraploid
Verhältnis zu haploid	1,35	1,65
Verhältnis zu diploid	-	1,22

Aufgrund der Polyploidisierung der somatischen Zellen durch Chromosomenverdopplung kann die Ploidiestufe bei den Varianten von *Pelargonium zonale* hier im Allgemeinen als Zweier-Potenz angegeben wurden, um die Analyse zu vereinfachen. Daraus folgt:

die somatische Ploidiestufe: $2n = 2^k$

die Haploidie: $2n = 1 = 2^0$, $k = 0$,

die Diploidie: $2n = 2 = 2^1$, $k = 1$,

die Tetraploidie: $2n = 4 = 2^2$, $k = 2$,

die Oktoploidie: $2n = 8 = 2^3$, $k = 3$ usw.

Nach der mathematischen Formel ist die Regressionsfunktion zwischen den untersuchten Sollwerten und den bekannten Basiswerten der Stomatalänge:

$$y = b_0 + b_1 k$$

y = Sollwert der Stomatalänge der untersuchten Objekte

k = Variable der Potenz der Ploidiestufe der untersuchten Objekte

b_1 = Steigung ist ein Maß für die Änderung entlang der Regressionsgeraden.

$$b_1 = \frac{n \sum ky - (\sum k)(\sum y)}{n \sum k^2 - (\sum k)^2}$$

b_0 = Ein Basiswert der Stomatalänge der Kontroll-Objekte mit bekannter Ploidiestufe, Funktionswert für $k=0$.

Anhand dieser Analyse von dem haploiden, diploiden sowie dem tetraploiden Klon wurde eine Bezugsformel zwischen Stomatalänge und ihren Ploidiestufen bei *Pelargonium zonale* aufgestellt. Damit kann man die Ploidiestufen höher polyploidisierter Stomata abschätzen.

$$y = 6,94 k + b_0$$

$$\text{Ploidiestufe } 2n \approx 2^{(y-b_0)/6,94}$$

Dabei ist 6,94 die durchschnittliche Steigung b_1 nach der zweijährigen Analyse.

Beispielsweise lässt für die Stomatalänge der Haploiden der Wert 22,0 μm aus den vorliegenden Untersuchungen als Basis-Wert b_0 . Daraus ergibt sich folgende Gleichung:

$$y = 6,94 k + 22,0$$

Die mögliche, unbekannte Ploidiestufe einer Pflanze kann durch den Vergleich mit der Stomatalänge einer als haploid bekannten Pflanze errechnet werden.

$$\text{Ploidiestufe } 2n \approx 2^{(y-22,0)/6,94}$$

3.1.4 Stomatagrößen im Verlauf der Sprossentwicklung unterschiedlicher Klone aus 'Kleiner Liebling'

Die Zellen in den Blättern eines Sprosses befinden sich während des Wachstums in unterschiedlichen Entwicklungsphasen. Zellen im jüngeren Blatt sind noch in der Wachstumsphase, während die Zellen im ausgewachsenen Blatt eine maximale Größe erreicht haben. Die Stomatalängen verschiedener Laubblätter von 5 Sprossen, die am Spross von oben nach unten numeriert wurden, zeigten eine Entwicklungstendenz (Tab. 6). Die Mittelwerte der Stomatalängen an verschiedenen Laubblättern nahmen bei dem haploiden, diploiden und tetraploiden Klon mit der Steigerung der Blattposition zu. Ältere Blätter hatten signifikant längere Stomata als jüngere Blätter.

Die statistische Analyse zeigte, dass sich die Werte für das 1. und 3. Blatt signifikant von denen des 5. Blattes auf allen drei Ploidiestufen unterschieden, aber nur beim tetraploiden Klon eine maximale Differenz der Messwerte zwischen den benachbart gemessenen Blättern von 5,7 μm erreicht wurde, die dem Ploidie-Kriterium angenähert ist.

Die Stomatalängemessung der KB-Sprosse von 5/74/2 zeigte manchmal einige Inseln mit

größeren oder kleineren Stomata, aber eine Gesetzmäßigkeit der Verteilung dieser Inseln wurde nicht beobachtet. Die Differenz der Mittelwerte der Stomatalänge zwischen dem 1. und 7. Blatt von Klon 5/74/2 hingegen betrug ca. 21 µm. Dies entspricht einer dreimaligen Chromosomenverdoppelung bezogen auf die Ploidiestufe des haploiden Klons 'Kleiner Liebling'. Jedoch waren die Unterschiede der Mittelwerte zwischen benachbarten gemessenen Blättern bei Klon 5/74/2 unregelmäßig.

Tab. 6: Stomatalängen (in µm) des 1., 3. und 5. (bzw. 7) Laubblattes verschiedener Klone aus 'Kleiner Liebling' (Mittelwerte, ± Standardabweichung, Streubreite, n = 100 Stomata pro Blatt an 5 Sprossen, n = 150 für Klon 5/74/2).

	Haploider Klon	Diploider Klon	Tetraploider Klon	Klon 5/74/2
Blatt 1	20,8 ^a ± 1,8 16,0 - 25,0	26,5 ^a ± 2,2 18,0 - 31,0	32,6 ^a ± 2,7 25,0 - 38,0	39,4 ^a ± 7,0 24,0 - 55,0
Blatt 3	21,4 ^a ± 1,7 17,0 - 25,0	26,6 ^a ± 1,7 23,0 - 31,3	33,0 ^a ± 2,4 27,0 - 39,0	53,1 ^b ± 9,5 34,0 - 79,0
Blatt 5	22,9 ^b ± 2,0 16,0 - 31,0	27,4 ^b ± 1,8 23,0 - 31,3	38,3 ^c ± 3,6 31,0 - 47,0	54,1 ^b ± 8,4 42,0 - 88,0
Blatt 7	-	-	-	60,8 ^c ± 13,8 44,0 - 98,0

Mittelwerte in einer Spalte, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$; Tukey-Test bei haploidem und diploidem Klon; Nemenyi-Test bei tetraploidem Klon und Klon 5/74/2).

Die Häufigkeitsverteilungen der Stomatalängen der untersuchten Blätter hatten bei den haploiden und diploiden Pflanzen nur einen Gipfel. Die Gipfelstelle der Häufigkeiten der Stomatalängen vom 1. bis 5. Blatt verschob sich leicht nach rechts (Abb. 8). Dies weist darauf hin, dass die Stomatalängen der untersuchten Blätter in haploiden und diploiden Pflanzen bei *Pelargonium zonale* zu einer Ploidiestufe gehören und erst beim Wachstum der Blätter eine maximale Größe erreicht wurde.

Die Häufigkeitsdiagramme der Stomatalängen der drei untersuchten Laubblätter des tetraploiden Klons zeigten, dass die Stomatalängen im 1. und 3. Blatt den gleichen Gipfel und eine annähernde Normalverteilung besaßen (Abb. 8).

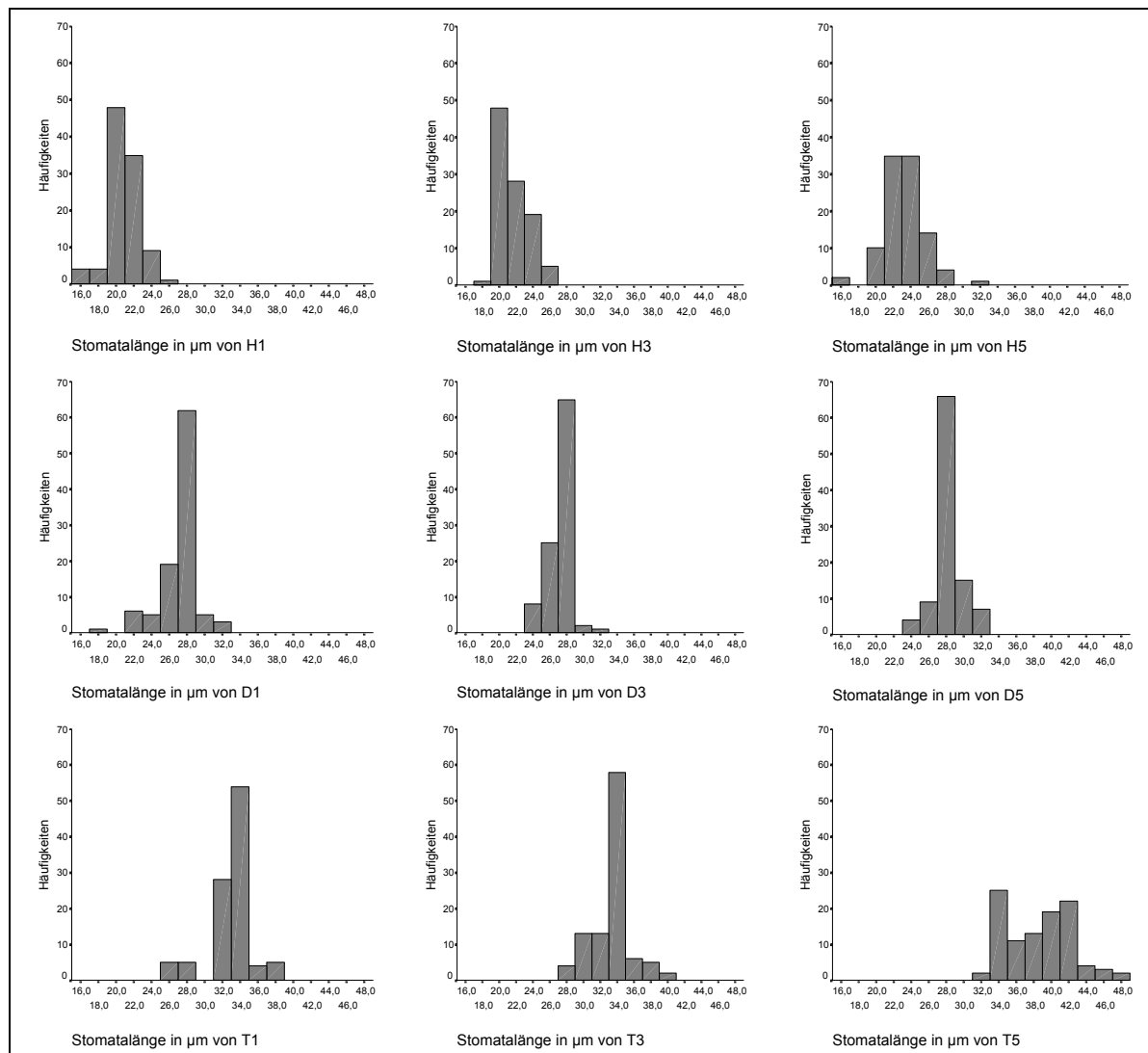


Abb. 8: Gegenüberstellung der Häufigkeitsdiagramme (Anzahl von Stomata) der Stomatalängen (µm) des 1., 3. und 5. Laubblattes von Pflanzen mit unterschiedlichen Ploidiestufen bei verschiedenen Klonen aus 'Kleiner Liebling' (n= 100 Stomata aus 5 Sprossen), H1= haploid, Blatt 1; D3 = diploid, Blatt 3; T5 = tetraploid, Blatt 5.

Für das 5. Blatt fand sich dagegen eine zweigipflige Verteilung. Außer dem normalen Gipfel bei 34 µm, der dem des 1. und 3. Blattes entsprach, trat ein weiterer bei 42 µm auf. Letzterer entspricht nahezu dem Ploidie-Kriterium und weist darauf hin, dass die Stomata im 5. Blatt der tetraploiden Pflanze möglicherweise bereits zwei unterschiedlichen Ploidiestufen angehörten.

Die Häufigkeitsdiagramme der Stomatalängen vom 1. bis 7. Blatt der typischen KB-Sprosse von Klon 5/74/2 zeigten mehrere Gipfel und sehr große Streubreiten (Abb. 9). Das wies daraufhin, dass die Epidermis verschiedenen Ploidiestufen existierte. Das ältere Blatt hatte höhere Stomatagrößen als das jüngere Blatt. Offensichtlich lag neben der üblichen Zellvergrößerung im Verlauf der Ontogenese eine atypische Entwicklung vor. Im Verlauf

der Blatentwicklung von Klon 5/74/2 kam es zur Bildung extrem großer Zellen. Daher ist anzunehmen, dass die Zellpolyploidisierung des Blattes mit der Entwicklung des Gewebes im Zusammenhang steht, d.h. die Epidermiszellen werden bei der Entwicklung des Gewebes weiter polyploidisiert.

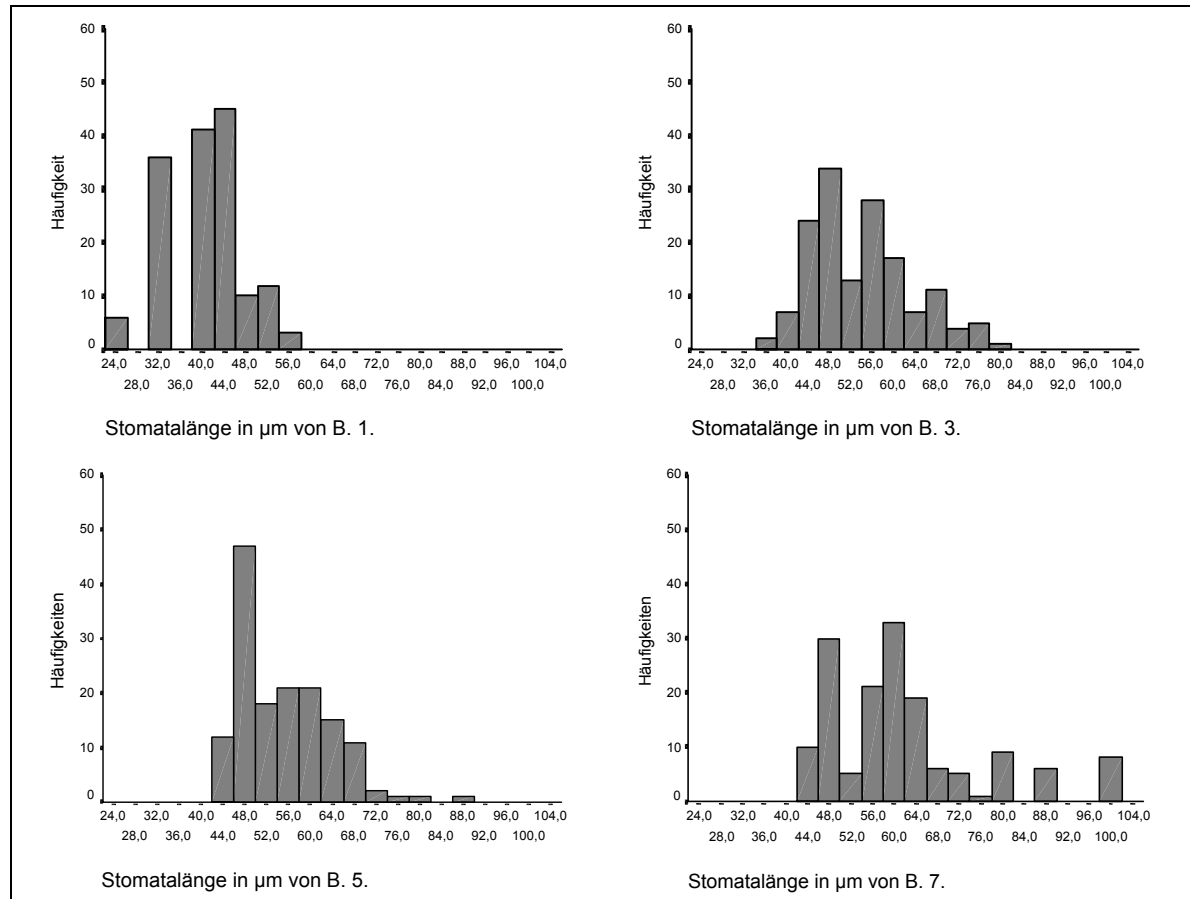


Abb. 9: Häufigkeitsdiagramme (Anzahl von Stomata) der Stomatalängen (µm) verschiedener Laubblätter von fünf typischen KB-Sprossen von Klon 5/74/2 (n= 150).

3.1.5 Stomatamessungen an Entmischungen des Klons 5/74/2

Innerhalb des Klons 5/74/2 neigen die einzelnen Pflanzen unterschiedlich stark dazu, morphologisch abweichende Sprosse zu bilden. Die aus 5/74/2 Pflanzen mit typischen KB-Blättern getriebene Sprosse mit kräuselten (K) oder stark behaarten (B) oder glatten und kurzhaarigen (N) Blättern wurden abgenommen und als K-, B- und N-Sports weiterkultiviert. An K- und B-Sports treten auch N-Sprosse auf. Im Verlauf der weiteren Entwicklung blieben diese N-Sports morphologisch stabil und ein Rückschlag von Typ 5/74/2 wurde niemals an N-Sports beobachtet.

An drei Pflanzen wurden die Stomatalängen der Ausgangspflanze und der Sprossaustriebe verglichen (Tab. 7). Die Stomatalängen von K- und B-Sports lagen in verschiedenen

Ploidiebereichen. Die Stomata der N-Sprosse aus KB-Pflanzen bzw aus K-, B-Sports, waren jeweils signifikant kürzer als die der entsprechenden Ausgangspflanzen und lagen in der Größenordnung des diploiden Klons von 'Weißer Liebling' (vgl. Tab. 4).

Tab. 7: Stomatalängen der Sprossastriebe im Vergleich zu den Ausgangssports (n = 50)

Ausgangssports	Spross- astriebe	Mittelwert (μm)	SD	Modalwert (μm)	Streubreiten (μm)
KB	KB	52,8 ^a	9,3	39,0;46,0;54,0;62,0;69,0	34,0 - 71,0
	N	29,9 ^b	2,3	31,0	26,0 - 34,0
B	B	50,6 ^a	7,0	49,0; 42,0	36,8 - 68,8
	N	26,8 ^b	1,8	27,7	22,1 - 32,0
K	K	73,9 ^a	12,8	49,0; 74,0	49,0 -108,0
	N	30,0 ^b	2,3	30,0	24,0 - 36,8

Mittelwerte in einem Block, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Nemenyi-Test).

An Klon 5/74/2 wurden auch verschiedene Blätter mit morphologisch auffälligen Sektoren beobachtet (Abb. 10). Die Stomatalängen dieser Blattvariationen wurden ebenfalls gemessen. Die Stomata der N-Sektoren waren signifikant kürzer als die Stomata der KB-, K- und B-Sektoren und lagen auch in der Größenordnung des diploiden Klons 'Weißer Liebling' (Tab. 8). Somit lagen die Stomatalängen sowohl des neu aufgetretenen N-Sprosses als auch der N-Blattsektoren (Tab. 7, 8) überwiegend im diploiden Bereich.

Dagegen lagen die Stomatalängen des K- und B-Sprosses (Tab. 7) bzw. des K- und B-Sektors (Tab. 8) in verschiedenen polyploiden Bereichen, wie es auch an dem KB-Spross (Tab. 7) beobachtet wurde. Extreme Kräuselung and Behaarung scheint in den vorliegenden Fällen mit dem Auftreten extremer Stomata in Verbindung zu stehen. Die K- und B-Sports aus den KB-Pflanzen sind wahrscheinlich durch Entmischungen entstanden.

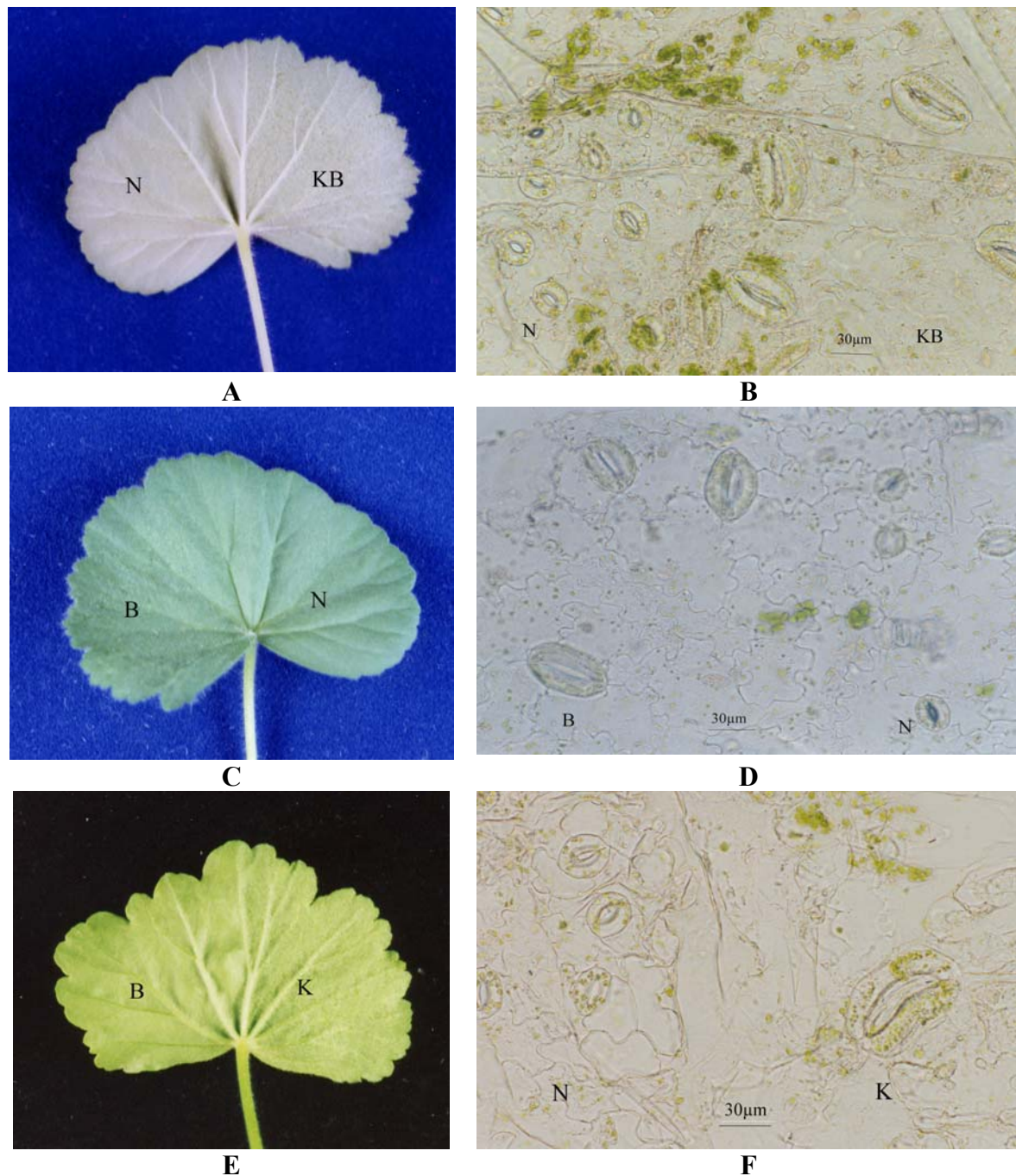


Abb. 10: Gegenüberstellung von Blättern mit auffälligen Sektoren und von Epidermisabzügen an Klon 5/74/2. **A- B.** KB-Blatt mit N-Sektor und Stomata in der Übergangszone einer KB-Pflanze, **C- D.** B-Blatt mit N-Sektor und Stomata in der Übergangszone einer B-Pflanze, **E- F.** K-Blatt mit N-Sektor und Stomata in der Übergangszone einer K-Pflanze.

Außerdem wurde somatische Ploidiereduktion anhand der Zellgrößen in der Epidermis bei zwei Pflanzen von Klon 5/74/2 beobachtet. Der Mittelwert der Stomatalängen in Pflanze 5 von Klon 5/74/2 mit gekräuselten und stark behaarten Blättern betrug 55,6 µm im polyploiden Bereich von 39-76 µm, der Mittelwert der Stomatalängen des ersten N-Sprosses 5/N(1) betrug 39,2 µm im tetraploiden Bereich von 32-47 µm. Jedoch lag der Mittelwert der Stomatalänge des Austriebes 5/N(2) aus dem ersten N-Spross 5/N(1) nur bei

25,8 µm im diploiden Bereich von 19-29 µm. Die Pflanze B3 von Klon 5/74/2 weist eine ähnliche Entwicklungstendenz auf (Tab.9).

Tab. 8: Stomatalängen in verschiedenen Sektoren auf Blattvariationen von Klon 5/74/2 (Abb. 10), in jedem Sektor wurden je 50 Stomata gemessen.

Blatt-Variante		Mittelwert (µm)	SD	Modalwerte (µm)	Streubreiten (µm)
KB (Abb. 10A, B)	KB-Blatt	55,5 ^a	8,9	52,0; 58,0; 63,0	37,0 – 78,0
	N-Sektor	31,3 ^b	4,3	25,0; 32,0; 37,5	22,0 – 37,0
B (Abb.10C, D)	B-Blatt	56,6 ^a	6,8	39,0; 49,0; 56,0	41,0 – 71,0
	N-Sektor	28,6 ^b	1,8	29,0	24,0 – 33,0
K (Abb. 10E, F)	K-Blatt	55,6 ^a	8,1	49,0; 54,0; 61,0	36,8 – 73,5
	N-Sektor	33,5 ^b	3,4	29,0	29,4 – 39,2

Mittelwerte in einem Block, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Nemenyi-Test).

Tab. 9: Stomatalängen und mögliche Ploidiestufe bei verschiedenen Sprossaustrieben von Klon 5/74/2

Pflanze	Mittelwert in µm	Modalwert in µm	Intervall in µm	Ploidiestufe	Jahr
5/KB	55,6	49,0	39,0-76,0	P	2000
5/N(1)	39,2	39,2	32,0-47,0	T	2000
5/N(2)	25,8	27,0	19,6-29,4	D	2001
B3-1	50,0	49,0	24,5-66,2	P	2000
-2	34,5	36,8	27,0-44,1	T	2001
-3	28,6	29,4	24,5-36,8	D	2001

3.2 Histologische Untersuchungen an Sprossscheiteln von *Pelargonium zonale*

3.2.1 Zellgröße in Sprossscheitelschichten verschiedener Klone aus 'Kleiner Liebling'

Histologische Schnitte zeigen, dass die Sprossscheitel von *Pelargonium zonale* nahezu halbkugelförmig sind und die meristematischen Initialzellen in mehreren Schichten angeordnet sind.

Im Längsschnitt durch den Sprossscheitel von 'Kleiner Liebling', HHH war die Zellgröße in den drei Scheitelschichten gleich (Abb. 11).

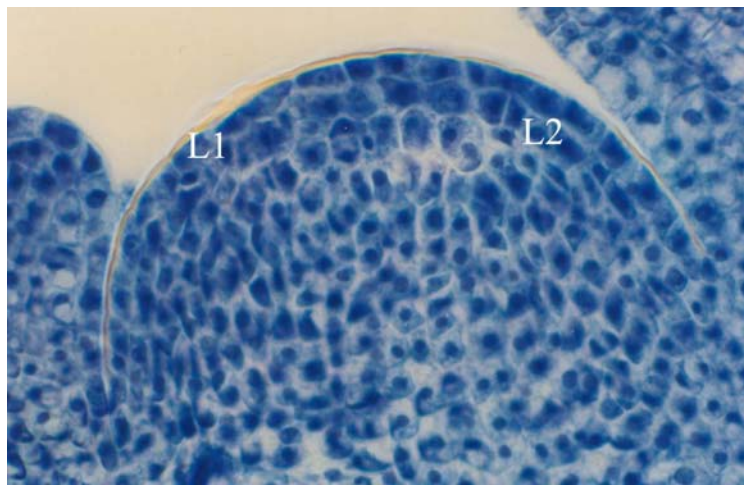


Abb. 11: Längsschnitt durch den Sprossscheitel von Sorte 'Kleiner Liebling'.

Das Häufigkeitsdiagramm der Zellgrößen in Radiusrichtung von drei Sprossscheitelschichten zeigte jeweils nur einen Gipfel (Abb. 12).

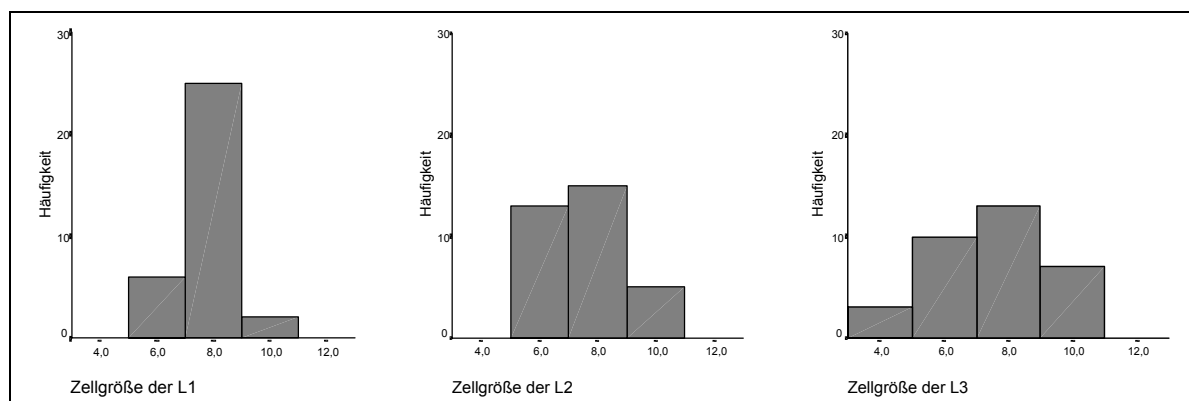


Abb. 12: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (μm) der drei Sprossscheitelschichten der haploiden Sorte 'Kleiner Liebling'.

Die statistische Prüfung der Zellgrößen bei Messungen in Radiusrichtung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellschichten (Tab.10).

Tab. 10: Zellgrößen in den Sprossscheitelschichten der haploiden Sorte 'Kleiner Liebling'

Schicht	N	Mittelwert (in μm)	SD	Streubreiten (in μm)
L1	33	7,7 ^a	0,8	6,3-9,4
L2	33	7,5 ^a	1,1	6,3-9,4
L3	33	7,5 ^a	1,3	4,7-9,4

Mittelwerte in einer Spalte, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Tukey).

Im Längsschnitt durch den Sprossscheitel von 'Weißer Liebling', HDD waren die Zellen in der L1 deutlich kleiner als die Zellen in L2 und L3 (Abb. 13).

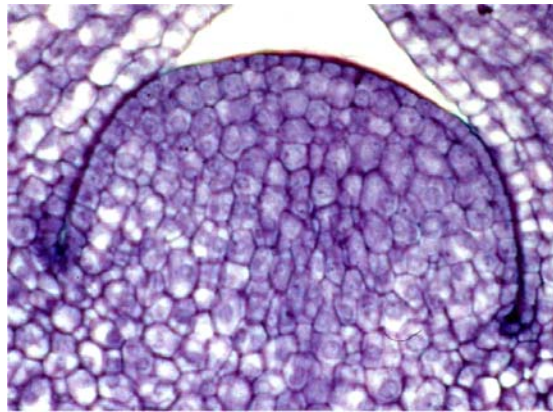


Abb. 13: Längsschnitt durch den Sprossscheitel des cytochimärishen Klons HDD (haploid-diploid-diploid) von 'Weißer Liebling'. Die Zellen in L1 sind deutlich kleiner als die Zellen in L2 und L3.

Das Häufigkeitsdiagramm der Zellgrößen in Radiusrichtung der drei Sprossscheitelschichten des cytochimärishen Klons HDD zeigte jeweils nur einen Gipfel (Abb. 14).

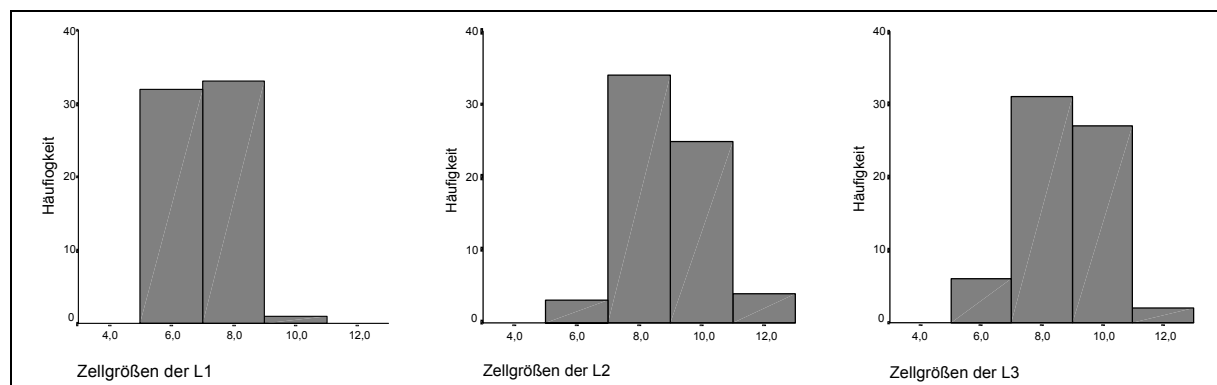


Abb. 14: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (in μm) der drei Sprossscheitelschichten des cytochimärishen Klons HDD von 'Weißer Liebling'.

Die Zellmessungen bei dem cytochimärischen Klon HDD von *Pelargonium zonale* 'Weißer Liebling' zeigten, dass die Zelldurchmesser in Radiusrichtung des Sprossscheitels in der haploiden L1 signifikant kleiner als die in der diploiden L2 und der L3 waren (Tab. 11). Die Größenunterschiede der Zellen der diploiden L2 und L3 waren nicht signifikant. Das Verhältnis der Mittelwerte der Zellgrößen zwischen den L1-Schicht und L2 oder L3 betrug ca. 1,2.

Tab. 11: Zellgrößen in den Sprossscheitelschichten des cytochimärischen Klons HDD von *Pelargonium zonale* 'Weißer Liebling'

Zellschicht	n	Mittelwert (µm)	SD	Streubreiten (µm)
L1 (haploid)	66	7,0 ^a	1,0	6,0 – 9,0
L2 (diploid)	66	8,5 ^b	0,9	6,0 – 11,0
L3 (diploid)	66	8,3 ^b	1,0	6,0 – 11,0

Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Tukey-Test).

3.2.2 Entwicklungen der L1-Zellen in Sprossscheiteln von Klon 5/74/2

Die Scheitel von 15 Achsel- und 11 Blütenknospen mit der somatischen Variabilität (Polyploidisierung) der Epidermis bei der Blattformentwicklung von Klon 5/74/2 wurden untersucht, um festzustellen, ob haploide, diploide bzw. polyploide L1-Zellen bzw. L1-bürtige bereits im Sprossscheitel bzw. Blütenknospen nachweisbar sind.

In 7 von 15 geschnittenen Sprossen wurde beobachtet, dass die Zellen in L1 weit größer waren als die in L2 und L3 bzw. die in haploiden Sprossscheiteln (Abb. 15, vgl. Abb. 11, 13). Größere Zellen in der ersten Zellschicht wurden ebenfalls in 3 von 11 Blütenknospen gefunden. Die Zellgrößen in den zwei inneren Scheitelschichten (L2 und L3) unterschieden sich untereinander nicht. Auf Grund der Zellgrößenunterschiede kann man annehmen, dass die in diesen Fällen untersuchten Pflanzen des Klons 5/74/2 bereits periklinale Cytochimären waren.

Die Zelldurchmesser in Radiusrichtung in L1, L2 und L3 von Sprossscheiteln liegen in Tabelle 12 vor (vgl. Tab. 10, 11). Die Mittelwerte unterschieden sich signifikant. Diese Parameter waren bei L1-Zellen um das ca. 1,7 fache größer als bei haploiden Zellen in L2

und L3. Bei Stomatamessungen entspricht eine 1,7fache Vergrößerung der Zelllänge einer zweimaligen Verdopplung der Ploidiestufe (vgl. Kap. 3.1.2), d. h. dass die L1-Zellen in diesem Fall wahrscheinlich tetraploid sind.

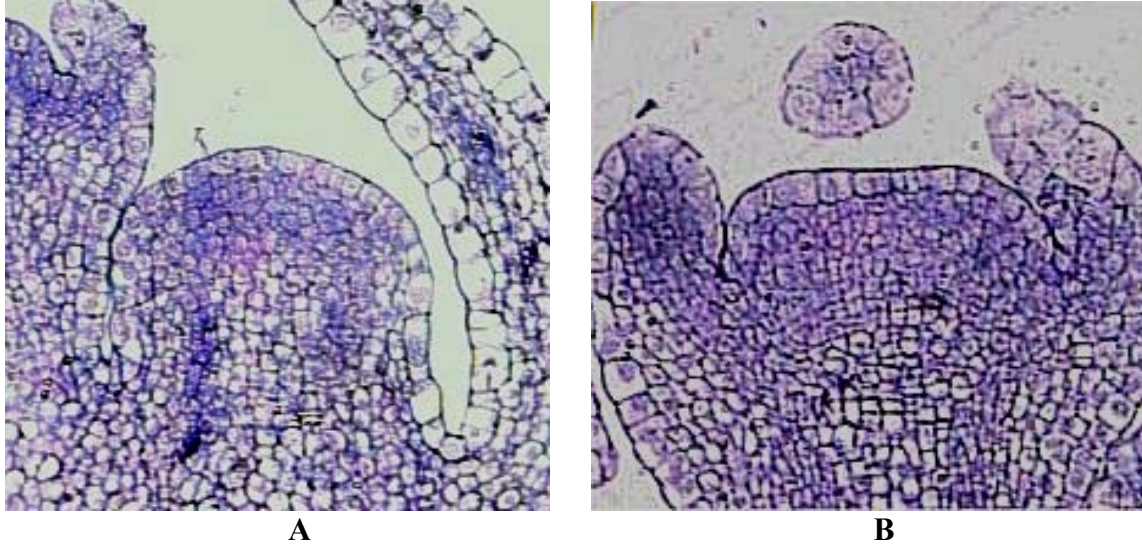


Abb. 15: Längsschnitte durch den Sprossscheitel mit stark vergrößerten Zellen in L1 von Klon 5/74/2. Sprossscheitel (A) und Blütenknospe (B) mit vergrößerten Zellen in der ersten Zellschicht. Dies zeigt, dass bereits eine Cytochimäre vorliegt.

Tab. 12: Zellgrößen der drei Sprossscheitelschichten der Pflanzen von Klon 5/74/2 mit stark vergrößerten Zellen in L1 (n = 72)

Zellschicht	Mittelwert (µm)	SD	Streubreiten (µm)
L1	12,7 ^a	1,5	9,8 – 17,2
L2	7,6 ^b	1,8	4,9 – 12,3
L3	7,2 ^b	2,0	4,9 – 14,7

Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Tukey).

Häufigkeitsdiagramme der Zellgrößen des Sprossscheitels zeigten, dass die Messwerte in allen drei Sprossscheitelschichten nur einen Gipfel aufwiesen (Abb. 16). Daher kann davon ausgegangen werden, dass in den hier untersuchten Sprossscheiteln in L1 die tetraploide Stufe vorlag. Das bedeutet, dass die L1-Zellen im Sprossscheitel bereits polyploidisiert und die Pflanzen der Klon 5/74/2 in diesem Fall Cytochimären PHH sind.

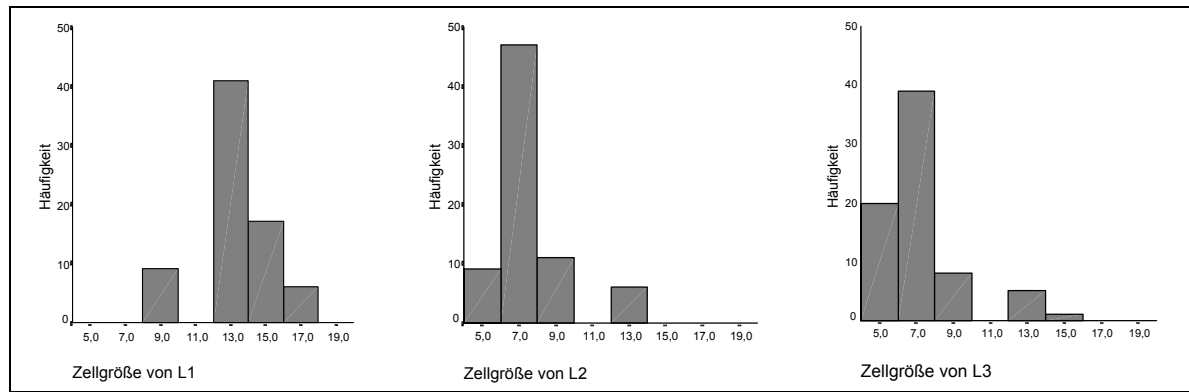


Abb. 16: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgröße (in µm) in drei Sprossscheitelschichten der Pflanze mit stark vergrößerten Zellen in L1 von Klon 5/74/2.

Im Gegensatz zu Abbildung 15 zeigt Abbildung 17 Scheitel mit kleinen L1-Zellen von Klon 5/74/2. In 8 von 15 geschnittenen Achselknospen wurde gefunden, dass die L1-Zellen am Gipfel teilweise in ihrer Größe mit Zellen der haploiden Innenkomponente (L2 und L3) übereinstimmten. Wenn der Scheitel getroffen wurde, konnte man die kleinen L1-bürtigen Zellen in der Mitte oder an einer Seite des Scheitels erkennen (vgl. Abb.11). Bei 8 von 11 geschnittenen Blütenknospen waren die Zellen der ersten Zellschicht genauso groß wie die der beiden darunter liegenden Zellschichten. Aber die Epidermiszellen an den Blattprimordien waren teilweise vergrößert (Abb. 17, Vgl. Abb. 15).

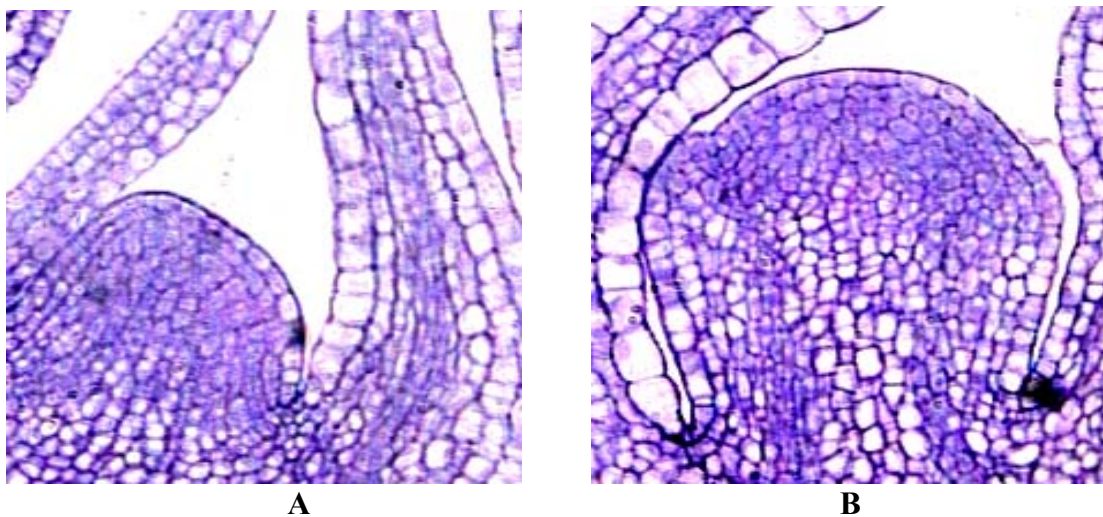


Abb. 17: Längsschnitte durch den Sprossscheitel mit kleinen Zellen in L1 von Klon 5/74/2 bei *Pelargonium*. A. Achselknospe, B. Blütenknospe. In beiden Abbildungen sind die Zellen der ersten Zellschicht nicht größer als die Zellen der tiefer liegenden Zellschichten. Die Epidermiszellen der Blattprimordien in der Nähe des Sprossscheitels sind bei der Blattentwicklung teilweise vergrößert.

Die Zellgröße in der äußersten Zellschicht unterschied sich nicht signifikant von den zwei inneren Zellschichten (Tab. 13) und der haploiden Pflanze (vgl. Tab. 10).

Tab. 13: Zellgrößen in Blütenknospenlängsschnitten einer Pflanze mit kleinen Zellen in L1 von Klon 5/74/2

Zellschicht	n	Mittelwert (µm)	SD	Streubreiten (µm)
L1-bürtig	63	7,8 ^a	0,9	6,0 – 9,0
L2-bürtig	63	7,4 ^a	1,2	5,0 – 9,0
L3-bürtig	63	7,4 ^a	1,4	5,0 – 11,0

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant ($p < 0,05$, Tukey).

Die Häufigkeitsdiagramme der Zellgrößen zeigten bei jeder Schicht nur einen Gipfel (Abb. 18). Chromosomenzählungen der kleinen L1-Zellen aus haploiden Bereichen liegen leider nicht vor. Aus dieser Größengleichheit lässt sich schließen, dass sich solche kleinen Zellen in L1 der betroffenen Pflanzen offenbar in haploidem Zustand befanden. Das stimmt mit der Beobachtung von LIEBAU (1988) überein.

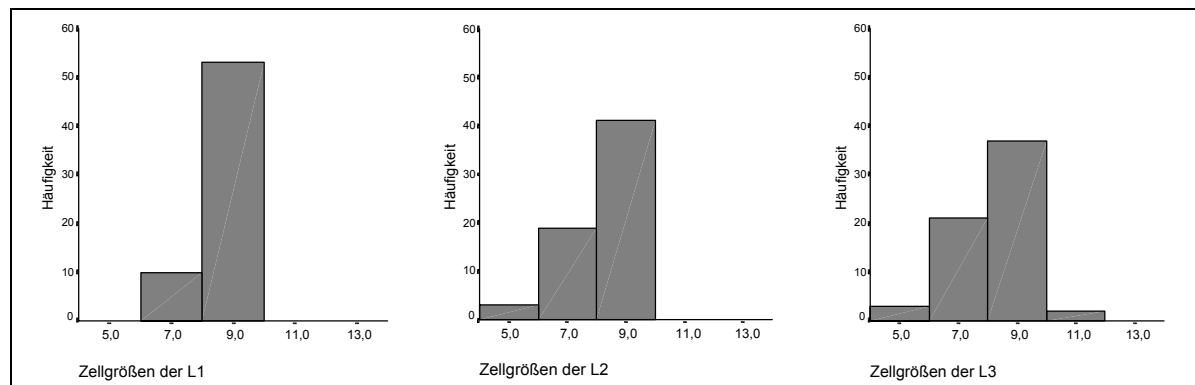


Abb. 18: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (in µm) der Mittelzone der Blütenknospe mit kleinen Zellen in L1 von Klon 5/74/2.

Außerdem wurden zwei Sprossscheitel mit leicht vergrößerten L1-Zellen ohne weitere somatische Variabilität (Polyploidisierung) der Epidermis bei der Blattprimordienentwicklung aus Klon 5/74/2 beobachtet (Abb. 19, vgl. Abb. 11, 15, 17). Die Mittelwerte der Zellgrößen dieser Sprossscheitel (gemessen in Radiusrichtung) zeigten signifikante Unterschiede mit einem Quotienten von 1,22 zwischen den L1-Zellen und L2- bzw. L3-Zellen (Tab. 14). Die Häufigkeitsdiagramme der Zellgrößen zeigten bei jeder Schicht nur einen Gipfel (Abb. 20). Das heißt, dass die L1 Zellen nach dem Quotienten (ca. 1,2) im diploiden Bereich liegen.

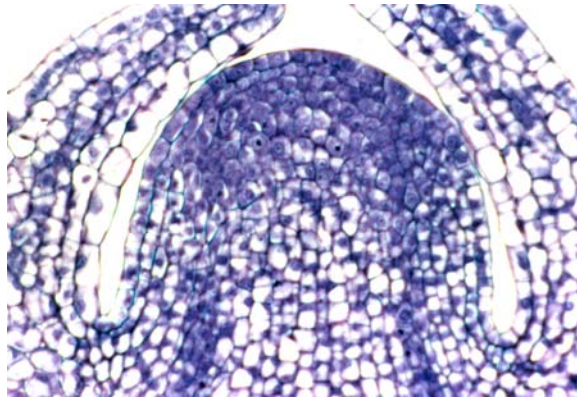


Abb. 19: Längsschnitt durch den Sprossscheitel mit leicht vergrößerten L1-Zellen ohne deutliche Zellvergrößerung in der Epidermis bei der Blatentwicklung von Klon 5/74/2.

Die diploiden L1-Zellen in diesen beiden Sprossenscheiteln und den diploiden Epidermiszellen sind wahrscheinlich durch L1-Perforation mit diploidisierten L2-Zellen entstanden. Auf diesem Wege können dann auch diploide N-Sprosse entstehen, die keine Rückschlüsse zur typischen Morphologie von Klon 5/74/2 aufweisen.

Tab. 14: Zellgrößen in Sprossscheitellängsschnitten der Pflanze mit leicht vergrößerten Zellen in L1 aus Klon 5/74/2 (siehe Abb. 19, n =50 Zellen)

Zellschicht	Mittelwert (µm)	SD	Streubreiten (µm)
L1	9,3 ^a	0,6	7,9 – 11,5
L2	7,6 ^b	0,5	6,3 – 9,4
L3	7,6 ^b	0,7	6,3 – 9,4

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant ($p < 0,05$, Tukey).

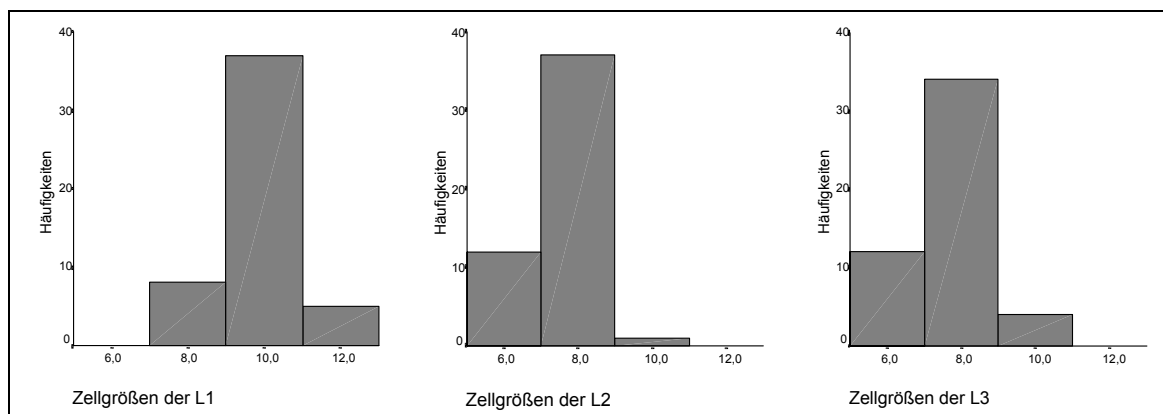


Abb. 20: Häufigkeitsdiagramme (Zellzahl) der Zellgrößen (in µm) der Scheitelschichten mit leicht vergrößerten Zellen in L1 von Klon 5/74/2 der Abbildung 19.

3.2.3 Entwicklungen der Epidermiszellen im Blatt von Klon 5/74/2

Vergleiche der Zellgrößen in L1 und den sich daraus ableitenden Epidermen (Abb. 21) zeigten, dass die Epidermiszellen, die weiter vom Sprossscheitel entfernt waren, größer waren als diejenigen, die nahe am Sprossscheitel lagen. Das spricht dafür, dass die Ploidieänderung der Epidermiszellen von Klon 5/74/2 offenbar nicht nur auf einen einmaligen Akt im Sprossscheitel zu führen ist, sondern auch häufig, unabhängig und extra-apikal stattfindet.

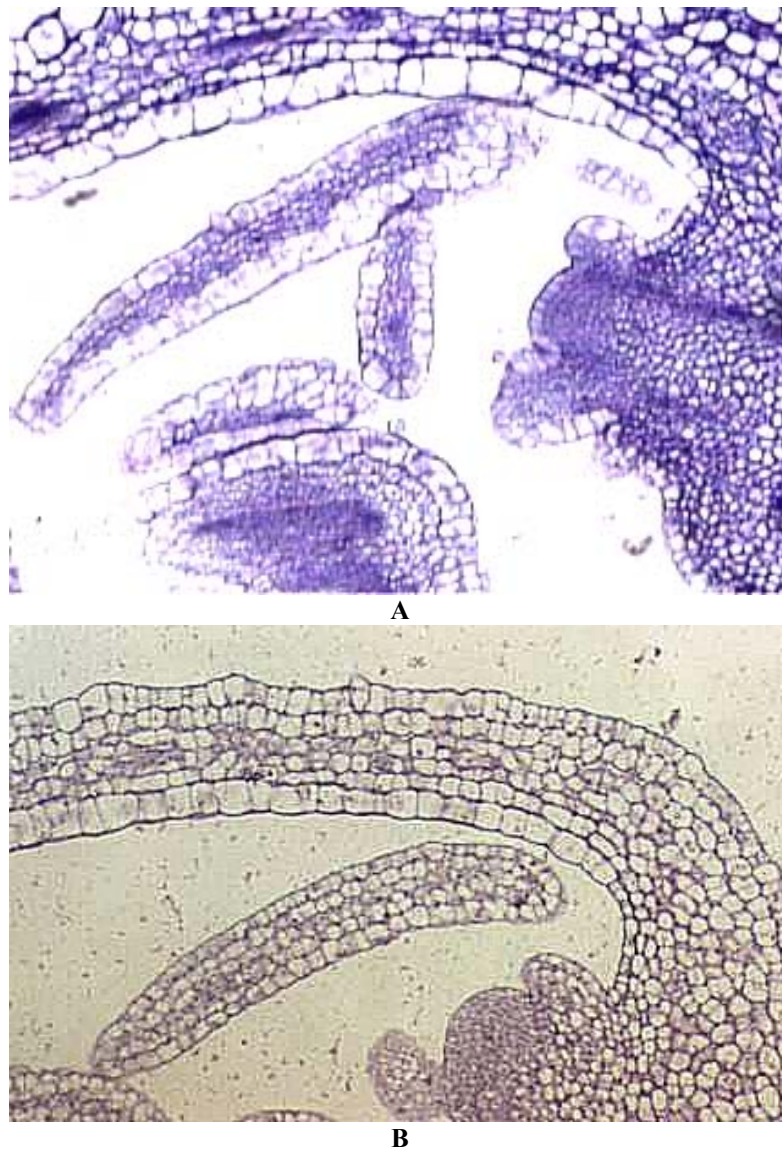


Abb. 21: Zellgrößenzunahme in der Epidermisschicht in verschiedenen Positionen bei Sprossscheiteln von Klon 5/74/2. **A.** Längsschnitt durch den Sprossscheitel mit vergrößerten L1-Zellen, **B.** Längsschnitt durch den Sprossscheitel mit kleinen L1-Zellen.

3.3 Chromosomenzählungen in cytochimärischen Geweben

Die Zellgröße bietet eine schnelle und einfache Methode zum Unterscheiden der Ploidiestufen. Jedoch kann die genaue Ploidieänderung in verschiedenen Zellschichten von Cytochimärengewebe nur über die direkte Chromosomenzählung bestimmt werden.

3.3.1 Einflussfaktoren für die Chromosomenbestimmung

- **Behandlungszeit mit Kolchizin**

Zur Beobachtung der Chromosomen spielt außer dem Entnahmezeitpunkt die Behandlungsdauer mit Kolchizin eine wichtige Rolle. Ohne Behandlung mit Kolchizin sind die Chromosomen bei *Pelargonium* ineinander gewickelt (Abb. 22A) und können nicht genau gezählt werden; auch nach einer Behandlungszeit von 3 Stunden mit Kolchizin sind die Chromosomen noch zu lang (Abb. 22B), und können bei Sprossscheitelschnitten zerschnitten werden, was die Ergebnisse verfälscht.

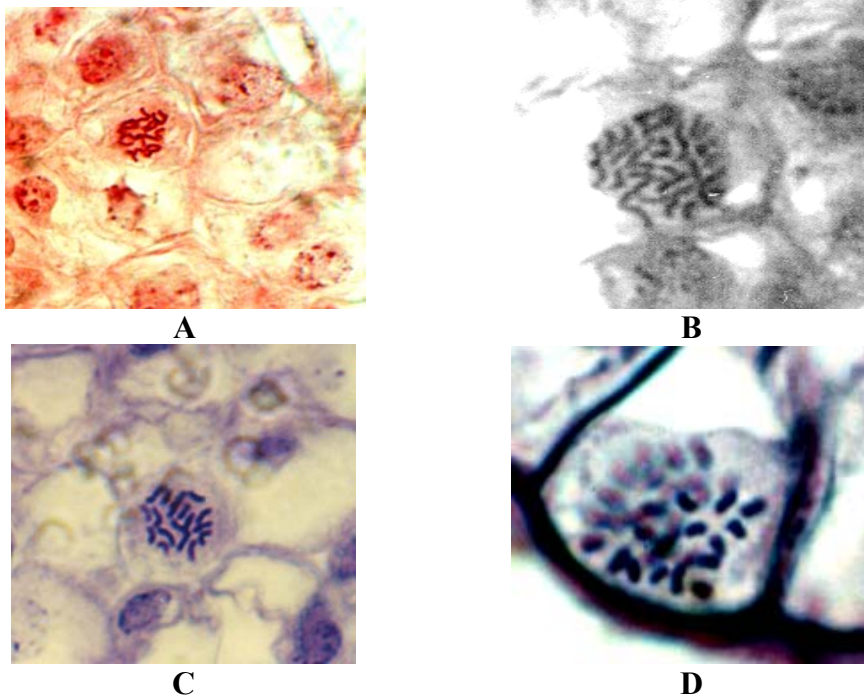


Abb. 22: Vergleich der Chromosomen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit 0,1%iger Kolchizinlösung für die Dauerpräparation.

- A. Ohne Kolchizinierung, mit Karmin-Essigsäure-Lösung gefärbt,
B. 3 h Kolchizinierung, mit modifizierter Feulgen-Lösung gefärbt,
C. 6 h Kolchizinierung mit Toluidinblau-Lösung gefärbt,
D. 20 h Kolchizinierung mit Hämatoxylin-Lösung gefärbt.

Bei einer 6stündigen Vorbehandlungszeit mit Kolchizin sind die Chromosomen kurz und

bei niedrigen Ploidiestufen zählbar (Abb. 22C). Die Behandlungszeit von 20 Stunden verkürzt die Chromosomen weiterhin und eignet sich für Zellen höherer Ploidiestufen (Abb.22D).

Die Behandlungszeit mit Kolchizin hängt also von der Art des Gewebes und von der Ploidiestufe der Zellen ab. Komplexere Gewebe wie Sprossspitzen und hochploide Zellen sollten für eine längere Zeit behandelt werden, weil dadurch die Chromosomen besser zählbar sind. Außerdem müssen in Serienschnitten die Zellen gezielt untersucht werden, damit eventuell angeschnittene Chromosomen nicht doppelt gezählt werden.

- Effekt der verschiedenen Farbstoffe

In Voruntersuchungen wurde die Eignung von vier Färbeverfahren (Tab. 15) verglichen. Alle getesteten Farbstoffe können Zellen, Chromosomen und Nukleoli gleichzeitig anfärben. Die Hämatoxylin-Lösung kann das schärfste histologische Bild der Schichtenkonstitution des Sprossscheitels schaffen. Mit der modifizierten Feulgen-Lösung lässt sich der Nukleolus besonders gut beobachten. Karmin-Essigsäure zeigt Chromosomen und Nukleolus deutlich, zerstört jedoch die Struktur des Einbettungsschnittes.

Tab. 15: Effekte der Farbstoffe auf die Beobachtung von Kernteilung und Chromosomen in Dauerpräparaten

Farbstoffe	Chromosomen	Spindeln	Nukleoli
Karmin-Essigsäure	***	-	***
Modifizierte Feulgen-Lösung	**	-	****
Hämatoxylin-Lösung	***	*	*
Toluidinblau-Lösung	****	****	*

- nicht erkennbar, *schwach, ** stark, *** stärker, **** am stärksten

Mit Toluidinblau-Lösung können nicht nur die Chromosomen, sondern auch die Spindelapparate sehr gut angefärbt und fotografiert werden (Abb.23), deshalb sind solche Präparate gut für die Untersuchung von Zellteilungsvorgängen geeignet.

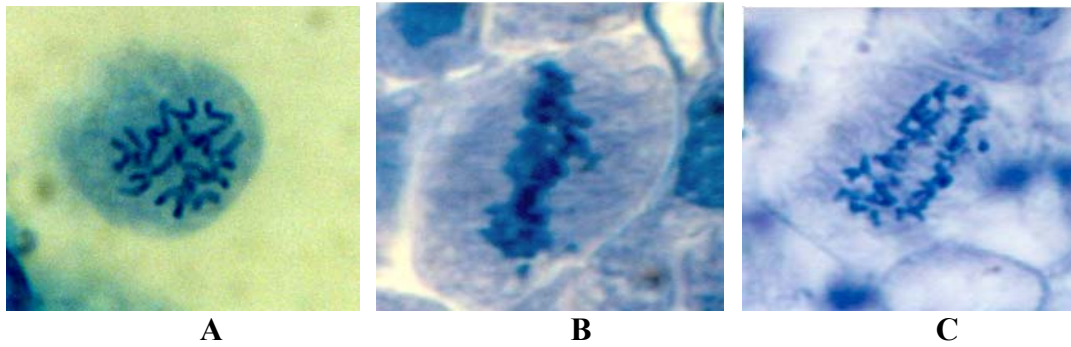


Abb. 23: Mit Toluidinblau angefärbte Chromosomen und Spindelapparate.
A. 18 Chromosomen in einer Haarzelle, B-C. Chromosomen in der Anaphase.

3.3.2 *Chromosomenzahlen in verschiedenen somatischen Zellschichten des Blattgewebes unterschiedlicher Klone*

In Blattlängsschnitten des homohistisch diploiden Klons von 'Weißer Liebling' wurden in Zellen der Epidermisschicht (Abb. 24A), der Subepidermisschicht (Abb. 24B) und des inneren Schwammparenchyms (Abb. 24C) in Dauerpräparaten schätzungsweise zwei Chromosomensätze (ca. 18 Chromosomen) ermittelt.

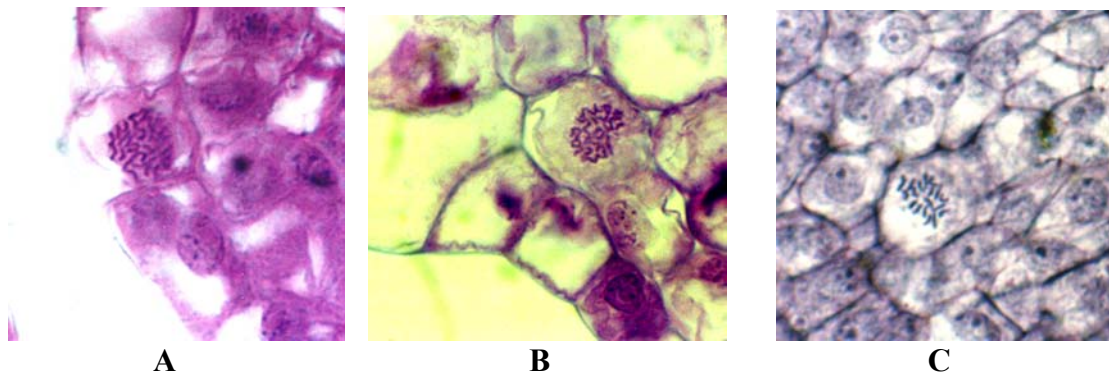


Abb. 24: Zellen mit erkennbaren Chromosomen in unterschiedlichen Blattschichten des Klons DDD von *Pelargonium* 'Weißer Liebling'. A. diploider Chromosomensatz in einer Epidermiszelle, mit modifizierter Feulgen-Färbung gefärbt, B. diploider Chromosomensatz in einer Subepidermiszelle, mit modifizierter Feulgen-Färbung gefärbt, C. diploider Chromosomensatz in einer Zelle der Innenkomponente mit Hämatoxylin-Lösung gefärbt.

Die Chromosomenzahlen in Epidermis- und Subepidermiszellen sowie in den Zellen der Innenkomponente von jüngeren Blättern des cytochimärischen Klons HDD von 'Weißer Liebling' zeigten übereinstimmende Ergebnisse mit den Scheiteluntersuchungen. Epidermiszellen enthielten nur einen Chromosomensatz (Abb. 25A). Die Zellen in der Subepidermisschicht und im mittleren Gewebe der Blätter hatten jeweils zwei Chromosomensätze (Abb. 25B-C). Zellen der Wurzel enthielten ebenfalls zwei Chromosomensätze (Abb. 25D).

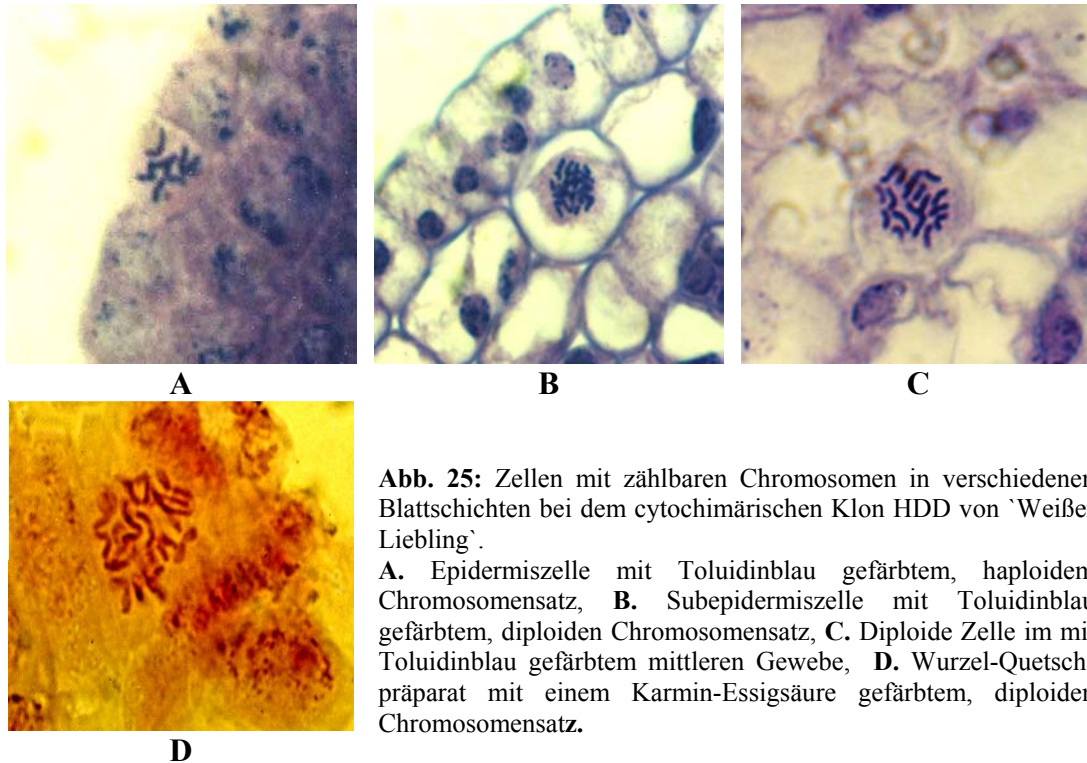


Abb. 25: Zellen mit zählbaren Chromosomen in verschiedenen Blattschichten bei dem cytochimärischen Klon HDD von 'Weißer Liebling'.

A. Epidermiszelle mit Toluidinblau gefärbtem, haploidem Chromosomensatz, **B.** Subepidermiszelle mit Toluidinblau gefärbtem, diploidem Chromosomensatz, **C.** Diploide Zelle im mit Toluidinblau gefärbtem mittleren Gewebe, **D.** Wurzel-Quetschpräparat mit einem Karmin-Essigsäure gefärbtem, diploidem Chromosomensatz.

Ebenso zeigten die Epidermiszellen in jüngeren Blättern von *Pelargonium zonale* 'Weißer Liebling', DHH eine diploide Chromosomenzahl, die Subepidermiszellen bzw. Zellen der inneren Komponente den haploiden Chromosomensatz (Abb. 26).

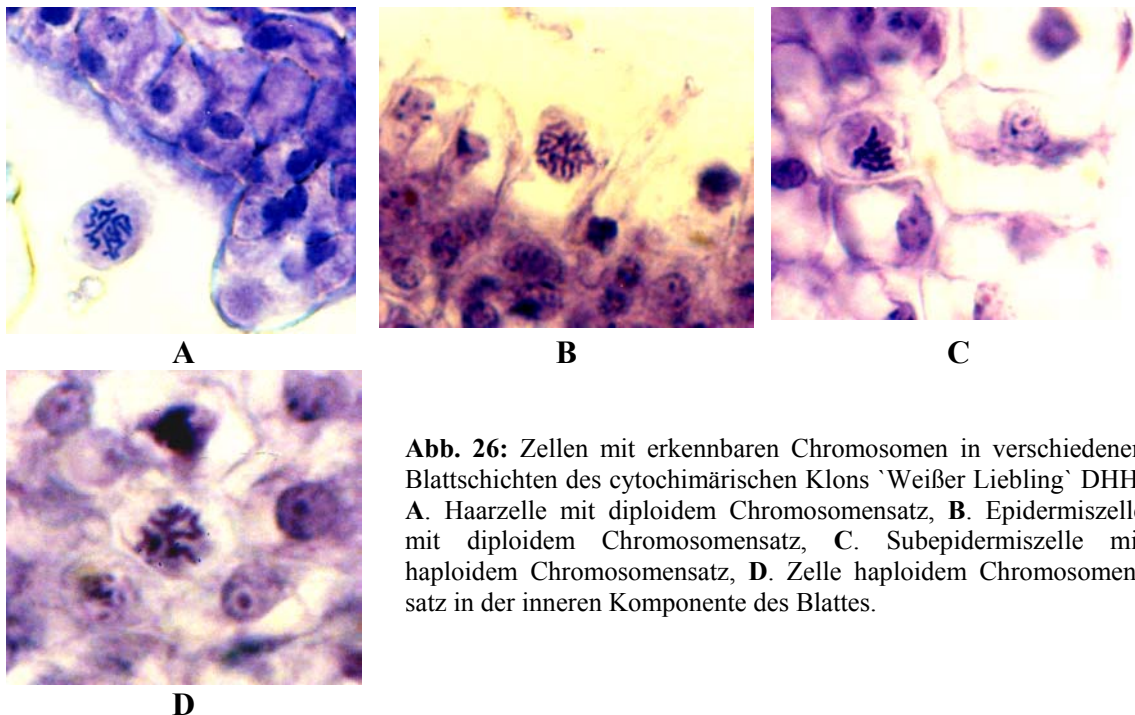


Abb. 26: Zellen mit erkennbaren Chromosomen in verschiedenen Blattschichten des cytochimärischen Klons 'Weißer Liebling' DHH. **A.** Haarzelle mit diploidem Chromosomensatz, **B.** Epidermiszelle mit diploidem Chromosomensatz, **C.** Subepidermiszelle mit haploidem Chromosomensatz, **D.** Zelle haploidem Chromosomensatz in der inneren Komponente des Blattes.

Die nach der Zellgröße geschätzten Ploidiestufen stimmten mit der Chromosomenzahl in den entsprechenden Zellschichten des jungen Blattes überein (Tab.16).

Tab. 16: Chromosomenzahl der verschiedenen Gewebeschichten der verschiedenen Klone von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' bzw. 'Weißer Liebling' (Zellanzahl = 5)

Klone	L1-bürtige Epidermiszellen	L2-bürtige Zellen	L3-bürtige Zellen im Blatt	Wurzelzellen
KL, HHH	9	9	9	9
WL, HDD	9	18	18	18
WL, DHH	18	9	9	9
WL, DDD	18	18	18	18

3.3.3 Chromosomenzahlen in somatischen Zellschichten des Blattgewebes von Klon 5/74/2

Eine hier abgebildete, vergrößerte Epidermiszelle von Klon 5/74/2 besaß nach Schätzung ca. 4 Chromosomensätze (Abb. 27A). Die anderen vergrößerten Epidermiszellen in Abbildung 27 B, C besaßen jeweils einen polyploiden Chromosomensatz. Im Gegensatz dazu besaßen die L2- und L3-bürtigen Zellen der inneren Komponente des Klons 5/74/2 (Abb. 28) wie die Ausgangspflanze 'Kleiner Liebling' nur einen haploiden Chromosomensatz.

Die Ergebnisse der Chromosomenzählungen an Epidermiszellen der Dauer- und Frischpräparate stimmen mit den Zellgrößemessungen der Stomata überein und zeigen, dass die L1-bürtigen Epidermiszellen von Klon 5/74/2 unterschiedliche Ploidiestufen hatten. Jedoch liegt die Chromosomenzahl im Sprossscheitel nicht vor.

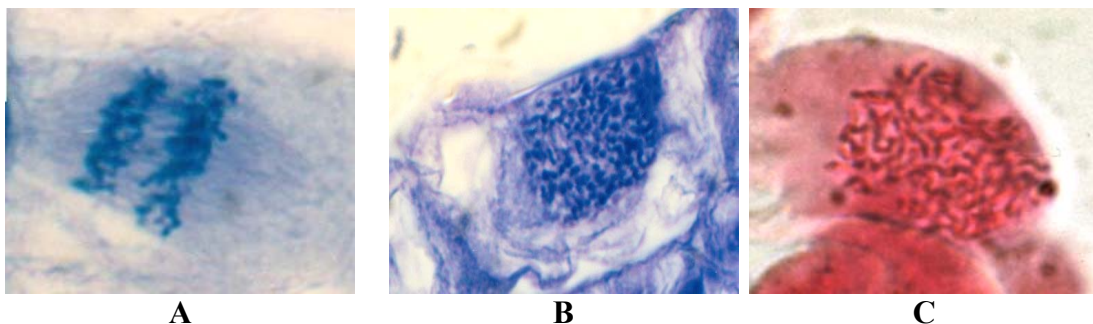


Abb. 27: Zellen mit verschiedenen Chromosomensätzen in der Epidermis von Klon 5/74/2. **A.** Epidermiszelle vermutlich mit tetraploidem Chromosomensatz in der Anaphase, **B-C.** Epidermiszellen vermutlich mit oktaploidem Chromosomensatz.

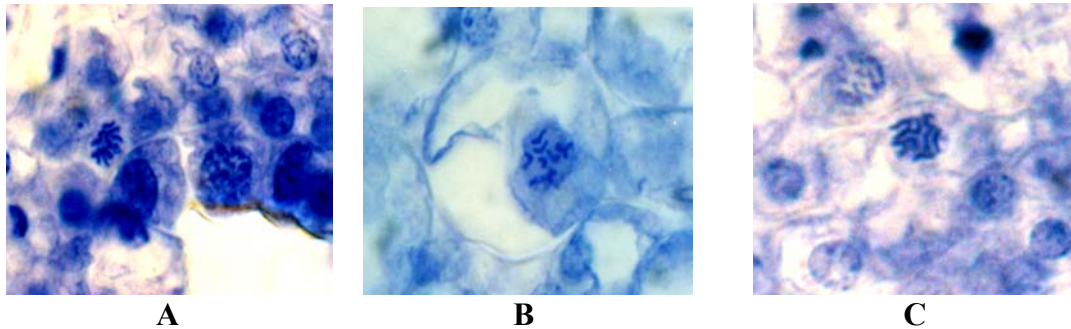


Abb. 28: Zellen mit 9 Chromosomen der inneren Komponentenschichten von Klon 5/74/2.
A. 9 Chromosomen in L2-bürtiger Palisadenzelle, **B-C.** 9 Chromosomen in L3-bürtigen Zellen.

3.3.4 Nukleolusanzahl in Zellkernen verschiedener Ploidiestufen

❖ Verhältnis zwischen der Nukleolusanzahl und Kerngrößen der Zelle

Der durch die modifizierte Feulgen-Lösung angefärbte Nukleolus besitzt eine größere, auffallende rundliche Struktur im interphasischen Zellkern (Abb. 29). Deshalb kann man ihn leicht von den anderen Organellen in den Zellen unterscheiden. Die Untersuchungen verdeutlichen, dass Kerne mit mehreren Nukleoli deutlich größer sind als diejenigen, die nur einen Nukleolus enthalten.

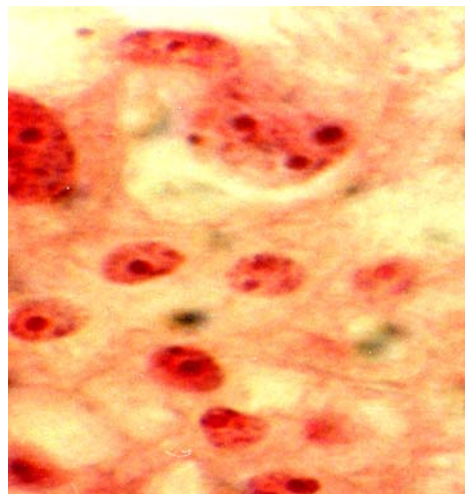


Abb. 29: Zellkerne mit verschiedener Nukleolusanzahl in dem Klon 5/74/2. Zellkerne mit mehreren Nukleoli in Epidermiszellen sind größer als die Zellkerne mit wenigen Nukleoli in Zellen der Subepidermis und Innen- Komponente.

❖ Verhältnis zwischen der Nukleolusanzahl und Chromosomenanzahl der Zelle

In Abbildung 30 sind zwei benachbarte Zellen in derselben Subepidermisschicht eines jüngeren Blattes der haploiden Pflanze von 'Kleiner Liebling' mit erkennbaren

Chromosomen und Nukleoli zu sehen. Eine Zelle befindet sich in der mitotischen Phase und hat einen deutlich erkennbaren einfachen Chromosomensatz, andere Zellen befinden sich in der Interphase und enthalten mehr als einen Nukleolus. Das kann als ein direkter Beweis gelten, dass haploide Zellen mehr als einen Nukleolus enthalten können.

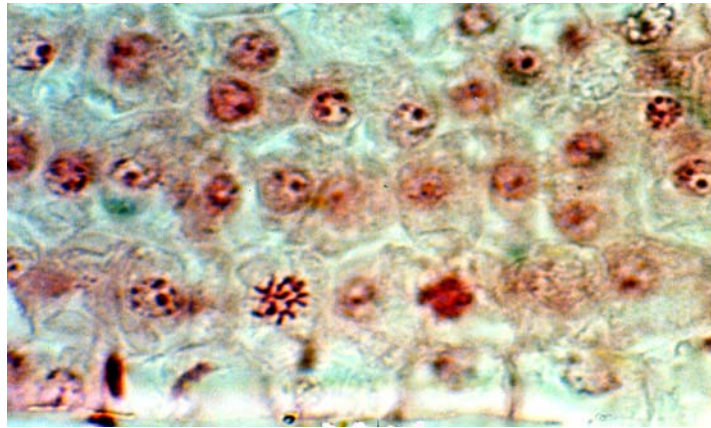


Abb. 30: Zellen mit erkennbaren Chromosomen und Nukleoli im Blattlängsschnitt des haploiden Klons 'Kleiner Liebling' (Kunststoff-Dauerpräparat).

Die in histologischen Untersuchungen direkt vergleichbaren Nukleoli- und Chromosomenzahlen beweisen, dass die Ploidiestufe in verschiedenen Zellschichten unterschiedlicher Klone bei *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' bzw. 'Weißer Liebling' mit der maximalen Nukleolusanzahl der Zellen nicht übereinstimmt (Tab.17).

Tab. 17: Maximale Anzahl der Nukleoli und Chromosomen in verschiedenen Zellschichten bei unterschiedlichen Klonen von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' bzw. 'Weißer Liebling'

Klon	Maximale Nukleolianzahl der Zelle (n = 50)			Chromosomenanzahl der Zelle (n = 5)		
	Epidermis	Sub-epidermal	Innenkomponente	Epidermis	Sub-epidermal	Innenkomponente (Wurzel)
KL, HHH	5	5	5	9	9	9
WL, HDD	4	5	5	9	18	18
WL, DHH	5	4	4	18	9	9
WL, DDD	4	4	4	18	18	18

3.4 *Cytologische Beobachtungen in Epidermiszellen von Klon 5/74/2*

In den vorliegenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Epidermiszellen von Klon 5/74/2 verschiedene Ploidiestufen aufwiesen. Es ist jedoch offen, welche cytologischen Anomalien für die verschiedenen Ploidiestufen verantwortlich sind.

3.4.1 *Reguläre mitotische Zellteilung der Epidermis*

In den Epidermiszellen der untersuchten Pflanzen von Klon 5/74/2 wurden verschiedene Stadien der normalen Mitose beobachtet, in der die Chromosomen durch die Funktion der Spindel regulär auf die zwei Zellpole aufgeteilt wurden (Abb. 31). In Zellen der Metaphase waren alle Chromosomen auf einer Äquatorialebene der Zelle angeordnet (Abb. 31A). Bei Zellen in der Anaphase wurden die Zwei-Chromatiden-Chromosomen mit Hilfe des Spindelapparates voneinander getrennt und zu den zwei Polen der Zelle gezogen (Abb. 31B, C). Ebenfalls wurden zwei gleichgroße Tochterkerne in der Telophase beobachtet (Abb. 31D). Dies weist darauf hin, dass sich auch die vergrößerten Epidermiszellen von Klon 5/74/2 durch einen normalen Mitoseablauf vermehren konnten.

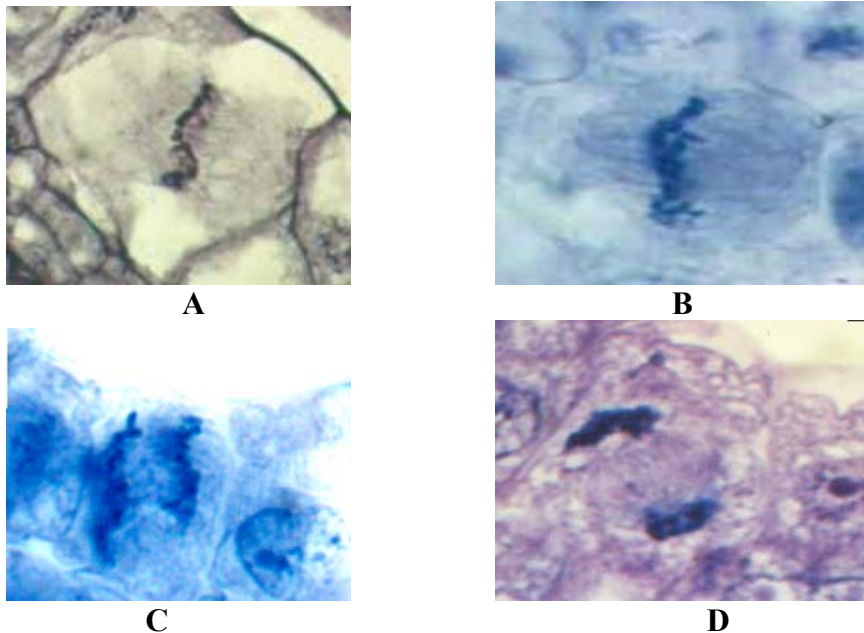


Abb. 31: Normale mitotische Zellteilung in Zellen von Klon 5/74/2. **A.** Zelle mit Chromosomen in der Metaphase, **B.** Zelle mit Chromosomen in der Proanaphase. **C.** Chromosomen in der Anaphase, **D.** Zellteilung in der Telophase.

3.4.2 Cytologische Anomalien in Epidermiszellen

In den Epidermiszellen von Klon 5/74/2 wurden bei den cytologischen Untersuchungen jedoch auch Anomalien der Zell- und Kernteilung festgestellt. In Schnittpräparaten wurden gestörte Metaphaseplatten gefunden, in denen sich nicht alle Metaphasechromosomen regelmäßig in der Äquatorialebene, sondern in verschiedenen unregelmäßigen Formen anordneten. Abbildung 32 zeigt zwei Beispiele solcher gestörten Metaphasen.

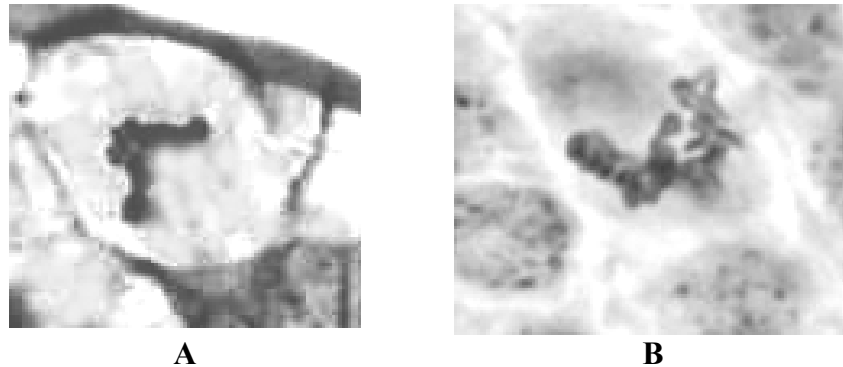


Abb. 32: Gestörte Metaphasen in mitotischen Zellen von Klon 5/74/2.

Durch irreguläre Anordnungen der Chromosomen in der Metaphase ist ihre reguläre und gleichmäßige Verteilung im Verlauf der Anaphase nicht mehr gewährleistet. Es kann zu Aufteilungen in mehr als zwei Gruppen und zu ungleich großen Gruppen kommen. Abbildung 33 zeigt ein Beispiel für die Aufteilung der Chromosomen in drei Gruppen.



Abb. 33: Epidermiszelle mit unregelmäßiger Chromosomenverteilung in der Anaphase von Klon 5/74/2.

In der Folge solcher gestörter Mitosen können Zellen mit mehreren Kernen entstehen, wobei es auch zur Bildung unterschiedlich großer Kerne kommen kann. Bei Klon 5/74/2 wurden in der Epidermis verschiedene mehrkernige Zellen beobachtet (Abb. 34, Abb. 35). Dabei wurden Zellen mit zwei oder drei annähernd gleich großen Kernen (Abb. 35A, Abb. 35D), mit einem Makro- und einem Mikrokern (Abb. 34A) sowie Zellen mit einem Makrokern und mehreren Mikrokernen (Abb. 34 B, Abb. 34C) gefunden. Das weist darauf

hin, dass teilweise die Cytokinese gestört war. Dies kann eine wichtige Ursache für die unregelmäßigen Polyploidisierungen in den Epidermis bei Klon 5/74/2 sein.



Abb. 34: Zellen mit mehreren Kernen in der Epidermis von Klon 5/74/2. **A.** Zwei ungleich große Kerne in einer Zelle, **B-C.** Zelle mit einem Makrokern und zwei Mikrokernen.

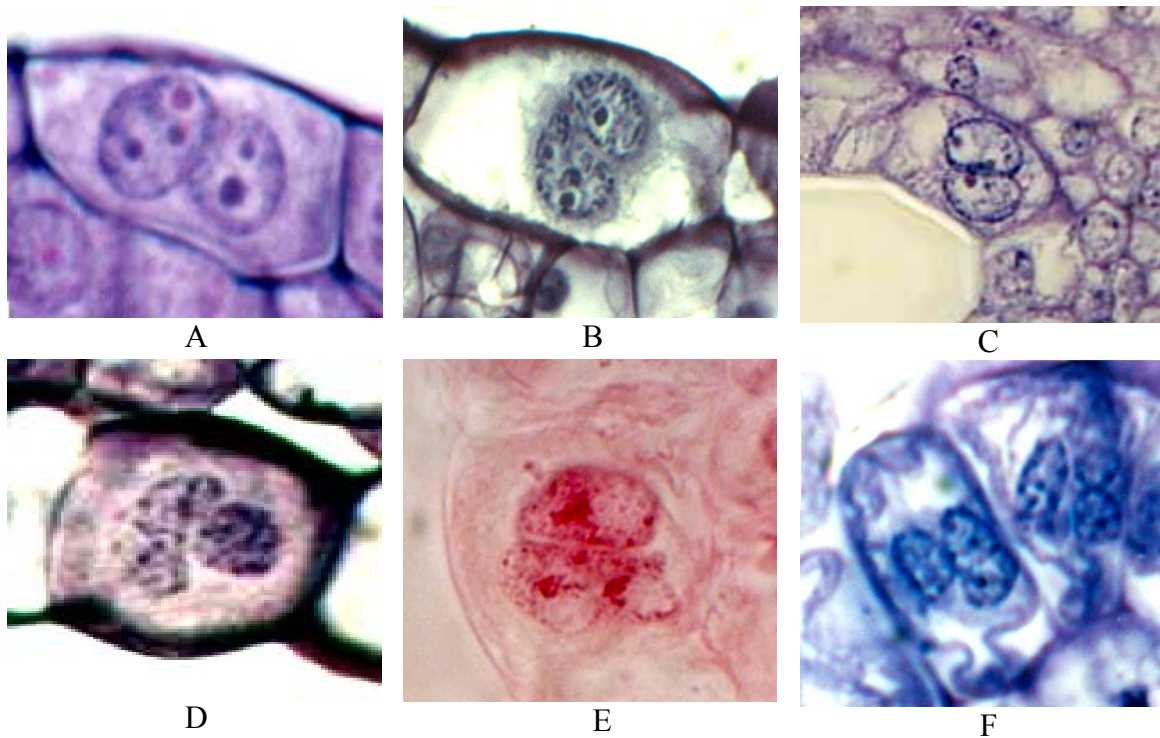


Abb. 35: Zellen mit unterschiedlichen Kernen in der Epidermis von Klon 5/74/2. **A.** Zwei Kerne mit unterschiedlicher Nukleolusanzahl in einer Zelle, **B-C.** Zelle mit zwei Kernen, **D-F.** Zelle mit drei Kernen.

Neben den oben gezeigten anomalen Chromosomenverteilungen und Zellen mit mehreren Zellkernen wurden in der Epidermis auch Zellen mit unregelmäßig geformten und eingeschnürten Zellkernen beobachtet (Abb. 36). So traten eingeschnürte U-förmige Kerne und Kerne mit zwei Einschnürungen auf (Abb. 37). Dies kann eine weitere Ursache für die unregelmäßigen Polyploidisierungen in den Epidermis bei Klon 5/74/2 sein

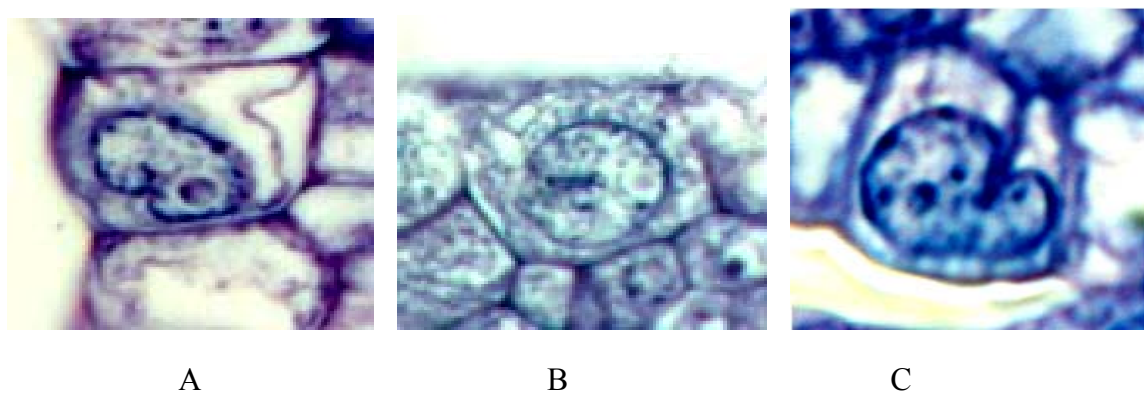


Abb. 36: Kerneinschnürung in Epidermiszellen von Klon 5/74/2. **A-B.** Eingeschnürter Zellkern in Epidermis, **C.** Einschnürung der Zelle und des Zellkernes.

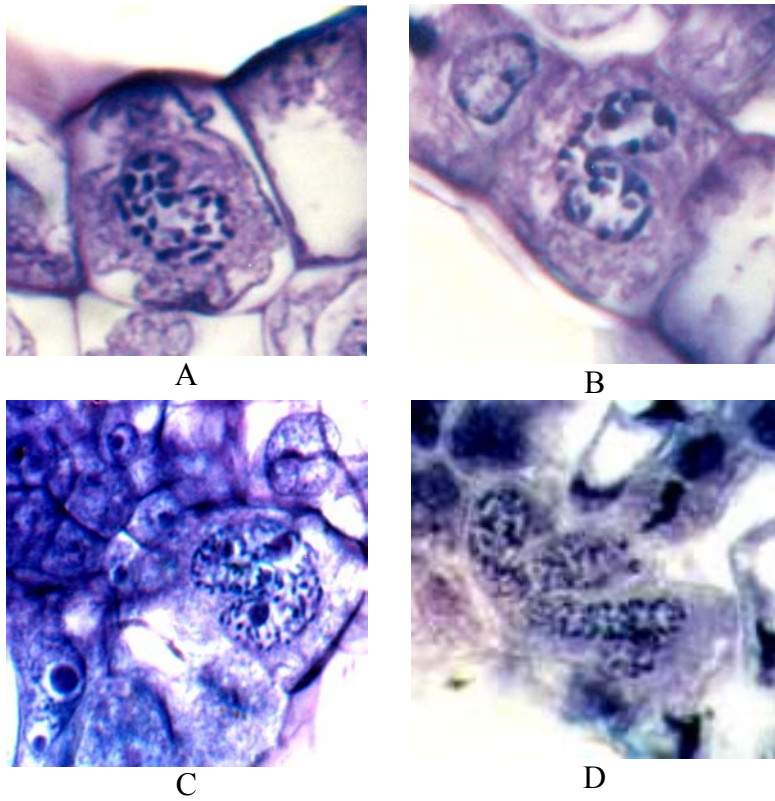


Abb. 37: Kerneinschnürungen in den Epidermiszellen von Klon 5/74/2. **A-C.** Kerne mit Einschnürung, **D.** Kern mit zwei Einschnürungen

3.5 In vitro-Kultur mit periklinalen Chimärengeweben von *Pelargonium zonale*

Es ist in der vorliegenden Arbeit gelungen, eine geeignete Methode für die *in vitro*-Kultur mit adultem Gewebe von *Pelargonium zonale* zu entwickeln. Es konnten bei verschiedenen Klonen Adventivpflanzen aus unterschiedlichen Geweben regeneriert werden.

3.5.1 Verfahrensoptimierung der Gewebekultur

- Effekte der verschiedenen Substanzen auf die Phenolbildung und die Kallusinduktion

Da das adulte Gewebe bei *Pelargonium zonale* auf dem Nährmedium schwarze, toxische phenolähnliche Substanzen anreichern kann (PIERIK 1997), entsteht ein schwarzer Ring um die Explantate (Abb. 38A), wodurch die Kallusinduktion oder das Gewebewachstum verhindert wird (HILDEBRANDT & HARNEY 1988; BAUER 1993; NEUMANN 1995; BOASE *et al.* 1998).

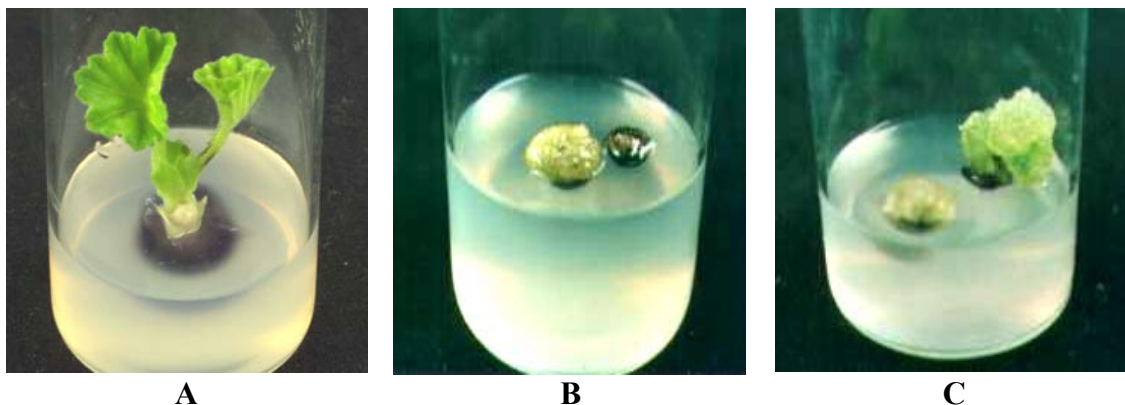


Abb. 38: Verminderung der Phenolbildung und Kallusinduktion von *Pelargonium zonale*. **A.** Explantate mit schwarzem Phenolring. **B–C.** Kallusinduktion nach Überführung von flüssigem Perlit-Medium auf das feste PVP-Medium.

Die getesteten Zusatzstoffe zur Verminderung der Phenolakkumulation zeigten unterschiedliche Wirkung (Tab.18). Die Verminderungseffekte auf die Bildung der Phenolverbindungen wurde anhand der Schwarzfärbung an den Schnittoberflächen der Explantate im flüssigen Medium bewertet. Die Papierbrücke konnte Phenolverbindungen adsorbieren. Jedoch war der Abstand zwischen Papier und Flüssigkeit nicht einfach zu regulieren, weil sich die Nährlösungsmenge durch Verdunstung im Kulturverlauf verringerte. 0,5 g/l Aktivkohle und 0,5 g/l PVP konnten die Bildung schwarzer Phenolstoffe in der Lösung vermindern. Die Explantate mussten jedoch mehrmals umgesetzt werden, sonst reichen auch diese Varianten nicht aus, um die Bildung von

Phenolen zu unterdrücken. Antioxidationsmittel wie Ascorbinsäure und Glutamin hatten keine deutliche Wirkung auf die Verminderung schwarzer Phenolverbindungen im Medium.

Tab. 18: Effekte der verschiedenen Substanzen im Kulturmedium bei der *in vitro*-Kultur von *Pelargonium zonale*

Material	Anzahl der Explantate	Phenolbildung an Explantaten	Explantate mit Kallusbildung (%)	Anzahl der Adventivsprosse
Sand	25	++	0	0
Papierbrücke	25	+++	0	0
Ascorbinsäure + Glutamin	25	+++	0	0
PVP	30	++	6,6	0
Aktivkohle	30	++	3,3	0
Perlit + PVP	280	+	13,0	346

+ Leichte Phenolbildung, beste Wirkung, ++ Mittlere Phenolbildung und Wirkung, +++ Starke Phenolbildung, schlechte Wirkung

Flüssiges Medium mit Perlite zeigte bei der Kalluskultur die beste Wirkung zur Verminderung der Phenolakkumulation in den vergleichbaren Varianten (Abb. 38B, C). Jedoch wurde das Wachstum der Kalli mit der Kulturdauer auf Perlite verlangsamt. Als beste Methode erwies sich, die Explantate in der ersten Phase auf Perlite mit flüssigem Medium bis zum Auftreten von Kallus zu kultivieren. Danach wurden sie auf festes PVP-Medium übertragen, um Adventivsprosse zu regenerieren (Tab. 18).

- **Effekte der Wachstumsregulatoren auf die Kallusinduktion und Adventivsprossregeneration**

Mit den Wachstumsregulatoren IAA und BAP konnte bei den vorliegenden Untersuchungen Kallus aus Blattgeweben und Stängelsegmenten induziert werden (Tab. 19). In den ersten vier Wochen entstand nur wenig Kallusgewebe. In dieser Zeit mussten die Explantate mindestens einmal pro Woche umgesetzt werden, sonst starb der Kallus

langsam ab. Der Zusatz von 2,4-D in die Medien induzierte in diesen Versuchen keinen Kallus. TDZ zeigte die beste Wirkung auf die Kallusinduktion und Regeneration von Adventivsprossen aus Explantaten bei *Pelargonium zonale*. Auf dem TDZ-Medium konnte der Kallus für längere Zeit vermehrt werden und Sprosse regenerierten. Sobald die regenerierten Sprosse auf ein Bewurzelungsmedium umgesetzt wurden, bildeten sich nach einer Woche Wurzeln.

Tab. 19: Effekte verschiedener Wachstumsregulatoren und Explantate auf die Kallusinduktion und Regeneration bei *Pelargonium zonale*

Wachstums- regulatoren	Explantate	Anzahl der Explantate	Explantate mit Kallusbildung abs. (%)	Anzahl induzierter Sprosse	Anzahl regenerierter Pflanzen
IBA 1 mg/l +BAP 2 mg/l	Blattsegment	25	0 (0,0)	0	0
IAA 2 mg/l + BAP 1mg/l	Blattsegment	30	1 (3,3)	0	0
	Stängelsegment	20	2 (10,0)	0	0
2,4-D 3 mg/l + BAP 2 mg/l	Blattsegment	25	0 (0,0)	0	0
	Blattsegment	50	0 (0,0)	0	0
TDZ 5mg/l	Stängelsegment	20	3 (15,0)	60	13
	Blattstiel	40	7 (17,5)	105	13
TDZ 2,2 mg/l	Blattsegment	40	0 (0,0)	0	0
	Stängelsegment	45	7 (15,6)	60	26
	Blattstiel	55	9 (13,8)	66	12
TDZ 0,75 mg/l	Blattsegment	50	6 (12,0)	35	25
	Blattstiel	25	5 (20,0)	20	5

Die optimale TDZ Konzentration war abhängig von der Art des Explantates (Tab. 19). Im Medium mit 5 mg/l TDZ verdickten sich die Blattstücke zuerst, dann starben sie ab. Jedoch war dieses Medium sehr gut geeignet für die Internodiensegmente und die ganzen Blattstiele. Bei diesen trat nach einer Woche Kallus auf. Das Medium mit 2,2 mg/l TDZ eignete sich für Blattstiel- und Internodiensegmente. Bei diesen wurden an den Explantaten direkt Kallus induziert und Sprosse regeneriert, ohne das Medium wechseln zu müssen.

Jedoch eignete sich das Medium nicht für Blattstücke. Eine niedrigere Konzentration von TDZ (0,75 mg/l) konnte für die Blattgewebe verwendet werden.

3.5.2 Einfluss der Zellschichtposition auf die Adventivprossregeneration

Die 10 Internodien- und 20 Blattstielexplantate von dreifach markierten chimärischen Ausgangspflanzen von 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR (Abb. 2 und Abb. 39) wurden auf das Medium gesetzt. Aus den Internodiensegmenten regenerierten 5 Adventivpflanzen und aus Blattstielexplantaten 4 Adventivpflanzen. Diese 9 Adventivpflanzen hatten grüne Blätter und weiße Blüten (Abb. 39C). Im Gegensatz zu den Ausgangspflanzen (Abb. 39B), die rote Blütenstiele besaßen, waren die Blütenstiele der Adventivpflanzen grün (Abb. 39 D).



A



B



C



D

Abb. 39: Ausgangs- und Adventivpflanzen des dreifach markierten chimärischen Klon 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR. **A.** Ausgangspflanze mit GWG-Blattmuster; **B.** Weiße Blüten der Ausgangspflanze mit rotem Blütenstiel, **C.** Adventivpflanze mit weißen Blüten und grünen Blättern, **D.** Weiße Blüten der Adventivpflanze mit grünem Blütenstiel.

Die Mittelwerte der Stomatalängen der 9 Adventivpflanzen lagen im Bereich von 28 – 44 μm und die Modalwerte der Stomatalängen lagen im Bereich von diploid bis zu 16-ploid (Tab.20). Davon lag die Stomatalänge von vier Adventivpflanzen im diploiden Bereich und von zwei Adventivpflanzen im tetraploiden Bereich. Drei Adventivpflanzen enthielten möglicherweise verschiedene Ploidiestufen in der Epidermis. Es zeigt sich eine Polyploidisierung durch Mutation während der Gewebekultur gegenüber konventioneller Vermehrungsweise. Es wurden keine haploiden Adventivpflanzen beobachtet.

Blatt- und Blütenfarbe der Adventivpflanzen aus dem dreifach markierten Klon 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR stimmten mit dem entsprechenden Genotyp der L1 (diploid, grünes Blatt, weiße Blüten) der Ausgangspflanze überein. Deshalb wurde geschlussfolgert, dass die Kallus- und Sprossbildung in diesem Experiment mit hoher Wahrscheinlichkeit von L1-bürtigen Zellen der Blattstielsegmente ausgehen.

Tab. 20: Stomatalängen der *in vitro* regenerierten Adventivpflanzen aus den dreifach markierten Geweben von 'Weißer Liebling' (DHH, GWG, WRR)

Adventivpflanze	Mittelwert (μm)	SD	Streubreiten (μm)	Ploidiebereich
1	31	2,8	25-37	D
2	28	1,8	25-32	D
3	44	6,8	32-66	T-O-16
4	34	2,5	29-37	T
5	37	5,9	27-51	D-T
6	36	4,8	25-44	T
7	28	1,8	25-32	D
8	32	3,2	25-41	D
9	39	5,6	28-57	T-O

3.5.3 Chimärenkonstitution der Adventivpflanzen von 'Mrs. Pollock'

Von Gewächshauspflanzen der Sorte 'Mrs. Pollock' wurden 20 Internodien- und 20 Blattstielsegmente (ohne Blattgrund) von Laubblättern jeder Konstitution GWG und GGW auf das Regenerationsmedium gestellt. Darüber hinaus wurden 55 Blattsegmente von ausgewachsenen Laubblättern aufgesetzt. Von den Internodiensegmenten regenerierten 84

Adventivsprosse und von den Blattstielsegmenten 101 Adventivsprosse. Die Blattsegmente bildeten keine Regenerate. Die *in vitro* regenerierten Adventivsprosse hatten verschiedene homohistische und chimäre Konstitutionen (Abb. 40).

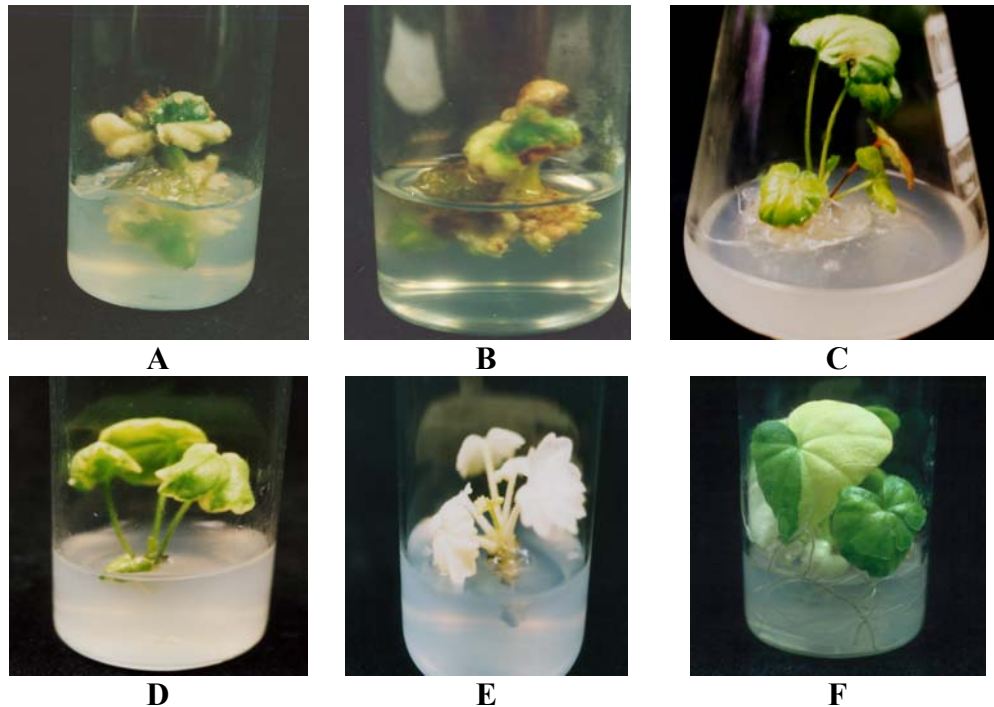


Abb. 40: Chimärische Adventivpflanzen aus der Sorte 'Mrs. Pollock'. **A-B.** Kallusinduktion; **C.** Chimärische Sprosse vom Typ GWG; **D.** Chimärische Sprosse vom Typ GGW; **E.** Chimärische Sprosse vom Typ GWW; **F.** Chimärische Sprosse mit sektoralen Blättern.

Bei den 185 Adventivsprossen aus den chimärischen Geweben von 'Mrs. Pollock' wurden unterschiedliche Blattmuster beobachtet, unter anderem einige neue Blattmuster, die nicht dem Ausgangsmuster entsprachen (Tab.21).

Tab. 21: Konstitution der *in vitro* regenerierten Adventivsprosse aus den Geweben von *Pelargonium* 'Mrs. Pollock'

Konstitution der Explantate	Anzahl induzierter Sprosse					
	Gesamtanzahl	Grün abs. (%)	Weiß abs. (%)	GWG abs.(%)	GGW abs.(%)	Sektorial abs. (%)
GWG	71	61 (85,9)	7 (9,9)	1 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)
GGW	114	49 (43,0)	48 (42,1)	5 (4,4)	3 (2,6)	9 (7,9)
Gesamt	185	110 (59,5)	55 (29,7)	6 (3,2)	4 (2,2)	10 (5,4)

Aus GWG-Geweben wurden 85,9 % grüne und 9,9 % weiße Adventivsprosse regeneriert und das bedeutet, dass die L2-bürtige weiße Zellen an der Adventivsprossbildung beteiligt

haben. Aus GGW-Geweben wurden 43,0 % grüne und 42,1 % weiße Adventivsprosse beobachtet. Das heißt, dass die L3-bürtige weiße Zellen an Adventivsprossbildung beteiligt haben. Das kommt Schluss, dass sich Zellen von mindestens zwei unterschiedlichen Gewebeschichten von Explantaten bei dieser Untersuchung an der Kallus- und Adventivsprossbildung beteiligt haben. Im Durchschnitt wurden bei 'Mrs. Pollock' 10,8 % chimärische Adventivsprosse regeneriert, 4,2 % chimärische Adventivsprosse aus den GWG-Explantaten und 14,9 % aus GGW-Explantaten. Davon sind insgesamt 8,6 % neuartige Chimären (GGW aus GWG, beziehungsweise GWG aus GGW und die Sektorialchimären), die sich in ihrer Konstitution von den Ausgangsexplantaten unterscheiden.

3.5.4 Ploidiestufe der Adventivpflanzen von 5/74/2

65 Internodien-, 50 Blattstielsegmente und 100 junge Laubblattexplantate (nicht entfaltet) von Klon 5/74/2 wurden bei diesem Experiment auf das Medium gelegt. Nach Kallusinduktion konnten 25 Adventivpflanzen regeneriert werden (Abb. 41, Tab. 22), dabei 9 von Internodien-, 15 von jungen Laubbattsegmenten und eine Adventivpflanze von Blattstielsegmenten.

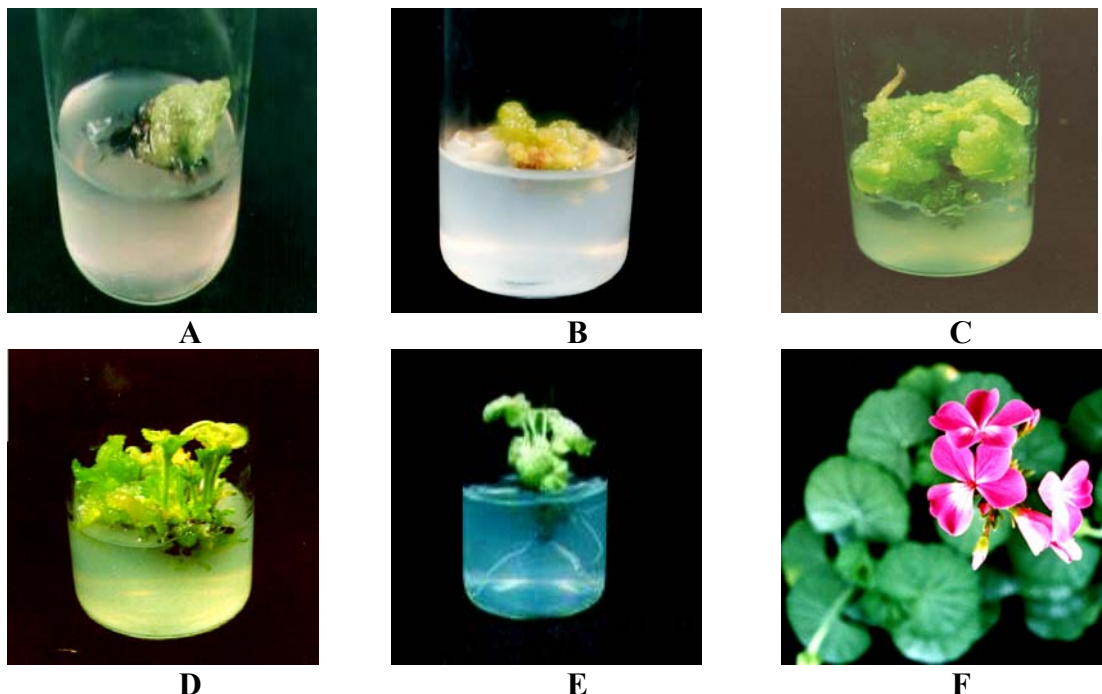


Abb. 41: Kallusinduktion und Regeneration von Adventivsprossen aus Klon 5/74/2. A-C. Kalluswachstum auf dem PVP-Medium, D. Sprossregeneration, E. Adventivpflanze mit Wurzeln, F. Adventivpflanze mit Blüten.

Alle Adventivpflanzen von Klon 5/74/2 aus der *in vitro*-Kultur hatten rote Blüten wie die Ausgangspflanzen. Jedoch waren die Blätter aller Adventivpflanzen weder gekräuselt noch

stark behaart. Das entspricht nicht der typischen Morphologie von Klon 5/74/2. Das heißt, dass die typische Morphologie von Klon 5/74/2, gekräuselt und stark behaart, sich über Kallus *in vitro*-Regeneration nicht reproduzieren ließ.

Tab. 22: Stomatalängen der *in vitro* regenerierten Adventivpflanzen von Klon 5/74/2

Pflanzen Nummer	Mittelwert (µm)	SD	Streubreiten (µm)	Ploidiebereich
1	34	4,6	27-47	D-T
2	34	3,4	27-39	D
3	36	4,1	30-44	D-T-O
4	31	3,6	25-39	D
5	29	3,1	24-36	D
6	28	1,2	25-32	D
7	29	1,8	25-37	D
8	28	2,9	25-29	D
9	29	2,5	25-34	D
10	28	1,2	25-29	D
11	31	3,2	25-36	D
12	27	2,6	24-33	D
13	31	2,3	27-39	D
14	30	2,7	24-38	D
15	31	2,4	25-35	D
16	33	3,6	27-39	T
17	29	3,8	25-37	D
18	32	3,1	27-39	D
19	33	3,2	25-37	D-T
20	33	3,6	27-37	D-T
21	30	3,2	25-37	D
22	35	3,2	29-47	T
23	34	3,2	27-39	D-T
24	36	3,4	24-42	T
25	30	4,4	25-37	D

Die Mittelwerte der Stomatalänge der *in vitro* regenerierten Adventivpflanzen aus den Geweben von Klon 5/74/2 lagen im Bereich von 27-36 μm (Tab. 22). Die Verteilungen der Stomatalängen von 20 der 25 Adventivpflanzen hatten nur einen Modalwert und 17 davon befanden sich im diploiden Bereich und drei im tetraploiden Bereich. Die der anderen 5 Adventivpflanzen hatten 2-3 Modalwerte und lagen in verschiedenen Ploidiestufen.

Deswegen wurden 17 Adventivpflanzen als diploid, vier als diploid-tetraploid, drei als tetraploid und eine als diploid-tetraploid-oktoploid bewertet. Das deutet auf Ploidie-mutation in der *in vitro*-Kultur hin.

Die Stomatalängen der Adventivpflanzen aus Geweben von 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR sowie von Klon 5/74/2 mit der Konstitution PHH wiesen darauf hin, dass die Epidermiszellen der meisten Adventivpflanzen aus DHH- sowie aus PHH-Geweben im diploiden Bereich lagen und nur selten im tetraploiden oder gemischten Bereichen. Die Ploidieverteilungen der Adventivpflanzen in beiden Fällen war ähnlich (Tab. 23). Die vorhandenen haploiden Zellen in beiden Explantatherkünften und die polyploiden Epidermiszellen von Klon 5/74/2 regenerieren offensichtlich nicht. Das heißt, dass die Regeneration von polyploiden Zellen der Epidermis von Klon 5/74/2 nicht gelungen ist.

Tab. 23: Ploidiestufenverteilungen der Epidermiszellen (%) der Adventivpflanzen von 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR und Klon 5/74/2

Explantate	n	Ploidiebereich der Stomatalänge (%)					
		diploid	diploid-tetraploid	tetraploid	diploid-tetraploid-oktoploid	tetraploid-oktoploid	tetraploid-oktoploid-16ploid
WL, GWG, WRR (DHH)	9	44,5	11,1	22,2		11,1	11,1
5/74/2 (PHH)	25	68,0	16,0	12,0	4,0		

4 Diskussion

4.1 Indirekte und direkte Ploidiebestimmungen

4.1.1 Indirekte Ploidiebestimmung über den Zellgrößenvergleich

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellgrößen der drei Sprossscheitelschichten von verschiedenen Klonen von 'Kleiner Liebling' bzw. 'Weißer Liebling' gemessen. Die Zellgrößen der haploiden L1, der diploiden L2 und L3 vom Klon 'Weißer Liebling', HDD waren bei der statistischen Analyse signifikant unterschiedlich (Kapitel, 3.2.1, Tab. 11). Das bestätigt das Vorliegen einer Cytochimäre mittels der Methode des Zellgrößenvergleichs und zeigt den Zusammenhang zwischen der Zell- bzw. Zellkerngröße und dem DNA-Gehalt bzw. der Ploidiestufe (FRANCO 1939; STRAUB 1941; BRYANS & SCHMITH 1985; DORE 1986; BROWN *et al.* 1991; MELARAGNO *et al.* 1993; VANDENHOUT 1995; MISHRA 1997; ABAK *et al.* 1998; TRAAS *et al.* 1998; SARI *et al.* 1999). Man bezeichnet diesen Zusammenhang als „Plasma-Kern-Beziehung“. Jedoch war das Zellgrößenverhältnis zwischen den haploiden L1-Zellen und den diploiden L2- oder L3-Zellen im Sprossscheitel in den vorliegenden Untersuchungen nicht wie das Verhältnis zwischen den Ploidiestufen 2, sondern hatte den Wert. 1,2.

Untersuchungen an Chimären zeigen, dass die L1 in der Regel nur die Epidermis bildet (SATINA *et al.* 1940; BURK *et al.* 1964; STEWART & BURK 1970; HOWARD 1978). Während Endopolyploidie für sehr viele verschiedene Gewebearten nachgewiesen wurde, herrscht bis jetzt allgemein die Ansicht vor, dass die Ploidiestufe von Stomata stabil bleibt (TSCHERMAK-WOESS 1971; MELARAGNO *et al.*, 1993). Deswegen wurden Messungen von Stomatalängen seit langem zur indirekten Ploidiebestimmung der L1-bürtigen Zellen herangezogen (FRANCO 1939; SPECKMAN *et al.* 1965; BINGHAM 1968; TAN & DUNN 1973; MELARAGNO *et al.* 1993; VANDENHOUT 1995; MISHRA 1997).

STRAUB (1941) beschreibt, dass sich die Mittelwerte der Stomatalänge von diploiden und tetraploiden Stomata bei Rotkohl wie 1:1,2 – 1,4 verhalten. Die Mittelwerte der Pollen verhalten sich beim di- und tetraploiden Tabak wie 1: 1,3. Dieses Verhältnis ist für verschiedene Arten unterschiedlich, innerhalb bestimmter Arten jedoch konstant und damit charakteristisch.

Das Verhältnis der Mittelwerte der Stomatalängen zwischen dem haploiden und dem diploiden Klon von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' bzw. 'Weißer Liebling' war größer als das Verhältnis der Stomatalänge zwischen dem diploiden und tetraploiden Klon (1,35 und 1,22, Kapitel, 3.1.3, Tab. 5). Die Regression (Bestimmtheitsmaß = + 0,8) der Stomatalänge mit der Ploidiestufe der Epidermiszellen war bei den haploiden, diploiden und tetraploiden Klonen von *Pelargonium zonale* bei $\alpha = 0,05$ signifikant. Das stimmt mit der Beobachtung von BRYANS & SCHMITH (1985) überein, dass es zwischen Ploidieniveau und Zellvolumen in einem bestimmten Bereich eine enge Korrelation gibt. Deswegen kann die Regressionsfunktion zur Ermittlung der Ploidiestufe der vergrößerten Zellen verwendet werden. Somit können die Ploidiestufen verschiedener Sprossspitzen an Chimärenpflanzen – ohne Pflanzen mit benachbarten Ploidiestufen zum Vergleich – indirekt abgeschätzt werden. Zellgrößenmessungen sind einfach durchzuführen.

4.1.2 Indirekte Ploidiebestimmung über die maximale Nukleolizahl der Zellkerne

Nukleoli sind Funktionsstrukturen des Zellkerns, in denen rRNA zur Bildung von Ribosomen bereitgestellt wird (ALBERTS & BRAY 1989; SMITH & WOOD 1996). In der Nucleolus-Organizer-Region (NOR) der Satellitenchromosomen sind die Gene für die rRNA lokalisiert, insofern steht die maximale Nukleolizahl der Zelle mit der Zahl der Satellitenchromosomen der Zelle im Zusammenhang (BROWN & BERTKE 1974; ADANIYA & ARDIAN 1994). BADR & HORN (1971) wiesen bei *Pelargonium zonale* – Hybriden ein Satellitenchromosom (Chromosom Nr. 9) nach, daher wäre bei haploiden *Pelargonium*-Pflanzen ein Nukleolus, bei diploiden *Pelargonium*-Pflanzen zwei Nukleoli zu erwarten, etc.

ADANIYA & ARDIAN (1994) berichteten, dass die maximale Nukleolizahl in diploiden Zellen bei *Allium* zwei ist, in tetraploiden Zellen vier. Die Nukleolizahl war unabhängig vom Alter und der Position des Blattes. Deshalb hatten sie vorgeschlagen, dass die Ploidiestufen der Cytochimären prinzipiell durch die maximale Nukleolizahl ermittelt werden können.

ALBERTS & BRAY (1989) beschrieben jedoch, dass in den diploiden menschlichen Zellen zehn winzige Nukleoli vorkommen können. Die Nukleoli sind jedoch nach der Mitose nur selten als getrennt erkennbar, sie wachsen sehr rasch und fusionieren zu einem einzelnen großen Nukleolus, der dann wieder typisch für viele Interphase-Zellen ist.

Untersuchungen zur Nukleoli- und Chromosomenanzahl in Mikrotomdünnschnitten verschiedener Klone bei *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass polyploidisierte, große Zellkerne mehr Nukleoli enthielten als haploide, kleine (Kapitel, 3.3.4, Abb. 29). Jedoch hatte die beobachtete maximale Nukleolizahl pro Zellkern der untersuchten Klone bei *Pelargonium zonale* kein bestimmtes Verhältnis zur Ploidiestufe der Zellen (Kapitel, 3.3.4, Abb. 29, Tab. 17). Das heißt, dass die maximale Nukleolizahl als Parameter zur Bestimmung der Ploidiestufe in cytochimärischen Geweben bei *Pelargonium zonale* nicht geeignet ist. Die vorliegende Untersuchung stimmt mit der Beobachtung von SMITH & PHAM (1996) überein, dass die Nukleolizahl vom Zelltyp und Entwicklungsstadium abhängig ist.

4.1.3 Direkte Ploidiebestimmung durch Chromosomenzählung

Die sicherste Methode zur Bestimmung der Ploidiestufe von Zellen in den verschiedenen Schichten des Chimärgewebes ist, direkt die Chromosomenzahl der Zellschichten zu bestimmen. Sollen Cytochimären näher charakterisiert werden, kann nicht auf Quetschpräparate zurückgegriffen werden, da die Zellschichten dann nicht voneinander unterschieden werden können.

Die L3-Deszendenten sind für die Ausbildung des inneren Gewebes und der Stecklingswurzel verantwortlich (BATESON 1916; BERGANN 1967; POETHIG 1984). Daher kann die Chromosomenzählung in der Wurzelspitze zur Ploidiebestimmung der L3 bei Cytochimärgewebe direkt benutzt werden. DAKER (1967) beobachtete aber, dass bei der Sorte 'Kleiner Liebling' im Wurzelbereich offenbar unregelmäßig polyploidisierte (diploide) Zellen auftreten, während Zellen des Sprossscheitels haploid sind. Deswegen muss die Aussage mit der Chromosomenzählung in der Stecklingswurzelspitze zur Ploidiebestimmung der L3 bei Cytochimärgewebe vorsichtig sein

Mikrotomdünnschnitte bieten die Möglichkeit, die Ploidiestufe der verschiedenen Zellschichten direkt zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Nutzung verschiedener Farbstoffe versucht, eine optimale Methode der Chromosomenzählung zur direkten Ploidiebestimmung für die unterschiedlichen Zellschichten der Cytochimären zu entwickeln. Es zeigte sich, dass die Toluidinblau-Lösung das beste Ergebnis zur Bestimmung der Chromosomenzahl in verschiedenen Zellschichten lieferte (Tab. 15). Damit wurden nicht nur die Ploidiestufen der Zellen in verschiedenen Gewebeschichten jüngerer Blätter verschiedener Klone von 'Kleiner Liebling' und 'Weißer Liebling' (DDD,

HDD und DHH) sowie Klon 5/74/2 durch Chromosomenzählung direkt geprüft (Kapitel 3.3.2, Tab. 16, Abb. 23-28), sondern auch Anomalien in Epidermiszellen von Klon 5/74/2 wie mehrkernige Zellen und eingeschnürte Zellkerne beobachtet (Kapitel, 3.4, Abb. 32-37).

Da die Zellen im Blattgewebe von drei Sprossscheitelschichten abstammen (POETHIG 1984), kann die Ploidiestufe von Cytochimären durch direkte Chromosomenzählung verschiedener Gewebeschichten an Mikrotomschnitten bestimmt werden. Trotzdem erlaubt die direkte Ploidiebestimmung durch Chromosomenzählung in Blattzellen nur indirekt und unzuverlässig Rückschlüsse auf die Zustände im Sprossscheitel, da die Zellen bei der Entwicklung des Blattes mutieren könnten.

4.2 *Entwicklung der somatischen Variabilität in Klon 5/74/2*

Die Stomatalängen der Laubblätter aller untersuchten Pflanzen der verschiedenen Klone von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' und 'Weißer Liebling' nahmen mit der Steigerung der Blattpositionen zu (Tab. 6, Abb. 8). Beim haploiden und diploiden Klon wurde keine somatische Variabilität der Epidermis von 1. Blatt bis 5. Blatt beobachtet, da die Unterschiede der Mittelwerte der Stomatalängen in verschiedenen Blätter nicht das Ploidie-Kriterium erreichten. Das heißt, dass die Stomata bei diesen beiden Klonen damit im Verlauf der Entwicklung des Blattes wahrscheinlich ihre maximale Größe erreichten. Die Verhältnisse der Stomatalängen lassen darauf schließen, dass beim tetraploiden Klon die Zellen der Epidermis im 5. Blatt zwei Ploidiestufen vorkommen. Es hat möglicherweise eine Mutation stattgefunden.

Durch die Auswertung der Stomatagrößen und Chromosomenzählungen wurde festgestellt, dass in der Epidermis des mutierten Klons 5/74/2 von *Pelargonium zonale* somatische Variabilität mit unterschiedlichen Ploidiestufen vorlag (Kapitel, 3.1.4, Tab. 6, Abb. 9, Kapitel 3.3.3). Epidermiszellen von Klon 5/74/2 erreichten beim Wachstum des Blattes nicht nur ihre maximale Größe, sondern waren auch polyploidisiert. Die Epidermis in jüngeren Blättern hatte niedrigere und weniger Ploidiestufen als die in älteren Blättern (Kapitel, 3.1.4, Tab. 6, Abb. 9). Somit nahm die minimale Ploidiestufe mit der Steigerung der Blattposition von Klon 5/74/2 zu. Das heißt, dass die unterschiedlichen Ploidiestufen in der Epidermis während der Entwicklung des Gewebes entstehen. Das ist vergleichbar mit den Beobachtungen von GALBRAITH *et al.* (1991) und BERGERVOET *et al.* (1996) in verschiedenen Geweben in *Arabidopsis* und Tomaten.

Die Chromosomenzählungen und Bestimmungen der Zellgrößen in den Mikrotomschnitten zeigten, dass somatische Variabilität in Form der gemischten Ploidiestufen nur in der Epidermis von Klon 5/74/2 auftrat, nicht jedoch in L2- und L3-bürtigen Zellen. Daher ist der Klon 5/74/2 eine periklinale Cytochimäre mit verschiedenen Ploidiestufen in der Epidermis. Solch eine Cytochimäre wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die Zellen in den histologischen Schnitten der Sprossspitze von Klon 5/74/2 haben gezeigt, dass die Polyploidisierung der Epidermiszellen in einigen Pflanzen bei Klon 5/74/2 schon im Sprossspitze begann und in anderen Pflanzen zumindest ein Teil der L1 noch haploid ist (Kapitel, 3.2.2). Die Größe der Epidermiszellen von Klon 5/74/2 nahm in beiden Fällen mit der Entfernung vom Sprossspitze zu (Kapitel, 3.2.3). Die L1-bürtige Epidermis ist in beiden Fällen teilweise polyploidisiert. Offensichtlich ist die Zellen in L1 von den Pflanzen mit vergrößerten Epidermiszellen von Klon 5/74/2 polyploidisiert und ihrer Abkömmlinge variabel. Die haploiden Zellen in L1 von den Pflanzen mit vergrößerten Epidermiszellen von Klon 5/74/2 sind durch Perforation von haploiden L2 entstanden. So setzt sich der Prozess der Polyploidisierung bei der Blattprimordiumbildung fort. Das steht im Gegensatz zur Darstellung von LIEBAU (1988), die von einer Polyploidisierung der Epidermis von 5/74/2 erst bei der Blattentwicklung ausgeht.

Das spricht dafür, dass die somatische Variabilität mit verschiedenen Ploidiestufen in der Epidermis vom Klon 5/74/2 bei *Pelargonium zonale* offenbar nicht nur auf einem einmaligen Akt im Sprossspitze zu führen ist, sondern auch häufig, unabhängig und extra-apikal stattfindet.

Die verschiedenen höheren Ploidiestufen in Epidermiszellen von Klon 5/74/2 sind wahrscheinlich durch unregelmäßige Polyploidisierung entstanden. Eine Mutation spielt vermutlich eine Rolle, die zu häufig und unregelmäßig auftretender Polyploidisierung während der Blattentwicklung führt. Endopolyploidie ist nicht selten in Angiospermen zu beobachten (LORZ 1947; D'AMATO 1964; 1984; 1989; DE ROCHER et al., 1990; SMULDER et. al., 1994, 1995; TRAAS et al. 1998; GRAFI 1995, 1998; KUDO & KIMURA 2001a,b), aber über eine solche Polyploidisierung wurde bisher noch nicht bei *Pelargonium zonale* berichtet. Die Ausbildung der verschiedenen Ploidiestufen wird möglicherweise durch mutierte Gene in Wechselwirkung mit äußeren Faktoren verursacht .

4.3 *Morphologische Besonderheit und somatische Variabilität von Klon 5/74/2*

Die Pflanzen mit stark beharrten und gekräuselten Blättern von Klon 5/74/2 waren nicht stabil und trieben Sprosse mit stark beharrten oder gekräuselten Blättern oder glatte Blätter mit kurzen Haaren aus (Kapitel, 3.1.5). Die Entmischung in starke Behaarung oder Kräuselung bedeutet, dass die Behaarung und Kräuselung wahrscheinlich keine fest gekoppelten Merkmale sind. Die Epidermis des gekräuselten Blattes und die Epidermiszellen des beharrten Blattes waren wie die des behaarten und gekräuselten Blattes unregelmäßig polyploidisiert. Die somatische Variabilität mit verschiedenen Ploidiestufen in der Epidermis trat hier nur zusammen mit der morphologischen Besonderheit der gekräuselten und/oder behaarten Blätter auf. In der Epidermis von N-Austrieben und auch in den N-Blattsektoren von Klon 5/74/2 kam dieses Phänomen nicht vor (Kapitel, 3.1.5, Tab. 7, 8, Abb. 10). Die Epidermiszellen in den meisten N-Sprossen mit glatter Blattform und kurzen Haaren lagen im diploiden Bereich. Die Blattkräuselung ist vermutlich eine Folge der somatischen Variation durch unregelmäßigen Polyploidisierungen. Areale der Epidermis mit stark vergrößerten Zellen wölben sich unregelmäßig auf. Die starke Behaarung wird wahrscheinlich durch polyploidisierte Haarzellen verursacht.

Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Blattkräuselung durch verschiedene Zellareale mit extrem unterschiedlichen Ploidiestufen in der Epidermis verursacht wird und die starke Behaarung durch polyploidisierte Haarzellen entsteht. Blattkräuselung kann aber auch durch andere Ursachen entstehen. Zum Beispiel ist bei Poinsettia die sogenannte Kräuselkrankheit durch mutative Wachstumshemmung bzw. Degeneration L2-bürtiger Zellen bekannt (BERGANN & BERGANN 1960).

4.4 *Austrieb von N-Sprossen an Pflanzen von Klon 5/74/2*

Die histologischen Untersuchungen zur Gewebeentwicklung wiesen darauf hin, dass die Zellen in L1 im Sprossscheitel mit vergrößerten Epidermiszellen von Klon 5/74/2 in zwei unterschiedlichen Zuständen vorlagen: Es gab Pflanzen, wo die L1 Zellen bereits polyploidisiert waren (Kapitel, 3.2.2, Tab. 12, Abb. 15, 16). In anderen Pflanzen war die L1 teilweise jedoch haploid (Kapitel, 3.2.2, Tab. 13, Abb. 17, 18).

Außerdem traten N-Sprosse auf, deren L1- Zellen und L1-bürtige Epidermiszellen diploid waren (Tab. 14, 7, 8, 9). Bei deren Blattentwicklung wurden nicht wie bei Klon 5/74/2 stark vergrößerte Epidermiszellen beobachtet (Abb.19). Wahrscheinlich entstehen solche N-Sprosse durch Zellumlagerungen im Sprossscheitel.

Denkbar wäre folgende Erklärung: Die typische Pflanze von Klon 5/74/2 ist eine Cytochimäre mit der Konstitution PHH. Die polyploide L1 im Sprossscheitel wurde durch L2-Zellen perforiert und verdrängt. Dadurch entstanden die Sprosse mit den kleinen L1-Zellen und den polyploiden Epidermiszellen.

Die Bildung von N-Sprossen mit diploider Epidermis, deren Zellen ursprünglich auf L2 zurückzuführen sind, würde ebenfalls erklären, warum an diesen Austrieben keine morphologischen Besonderheiten wie Kräuselung und Behaarung auftreten und auch kein Rückschlag zu Variante 5/74/2 zu finden ist.

STEIN (1936) berichtete über das Auftreten von $2n$ -Sprossen an Beständen hoch polyploider *Antirrhinum*-Pflanzen, die durch Mutagenbehandlung mit Radiumbestrahlung entstanden waren, wahrscheinlich durch Reduktionsmitose. Solche Möglichkeit kann auch in dieser Arbeit nicht völlig ausgeschlossen werden.

4.5 Cytologische Anomalien in der Epidermis von Klon 5/74/2

In den Epidermiszellen vom Klon 5/74/2 wurden verschiedene cytologische Anomalien beobachtet. In der Metaphase traten unregelmäßige Chromosomenplatten in einigen Zellen der Epidermis auf (Kapitel, 3.4.2, Abb. 32). Die in der Metaphase unregelmäßig angeordneten Chromosomen können auf mehrere Pole in der Anaphase verteilt werden (Abb. 33) (KUTZNER 1980; WHEATLEY & WANG 1996; RIEDER 1997; SLUDER *et al.* 1997, ECKLEY 1997). Man bezeichnet dieses Phänomen als multipolare Mitose (MAYZEL 1875; NEMEC 1926; SCHMID 1966; PERA & SCHWARZACHER 1969).

Die multipolare Mitose bewirkt eine Störung bei der Polwanderung der Chromosomen in Zellteilungen. Die multipolare Mitose wurde schon lange in kranken, mutagenbehandelten oder fusionierten Tierzellen beobachtet (PERA & RAINER 1973; KERYER *et al.* 1984; ALIEVA & VOROBJEV 1991; GLOVER *et al.* 1996; WHEATLEY & WANG 1996; RIEDER 1997; SLUDER *et al.* 1997). In mutierten Pflanzenzellen wurden multipolare Mitosen ebenfalls gefunden (STEIN 1927; 1936; HERVAS 1975; 1987; GIMÉNEZ-ABIÁN *et al.* 1998).

In der Epidermis von Klon 5/74/2 wurden verschiedene mehrkernige Zellen gefunden (Kapitel, 3.4.2, Abb. 34, 35) und es wird angenommen, dass die mehrkernigen Zellen durch multipolare Mitosen ohne Zellteilung entstanden sind. Dies kann eine wichtige Ursache für die unregelmäßigen Polyploidisierungen in den Epidermis bei Klon 5/74/2 sein.

Außerdem wurden Kernschnürungen in einigen Epidermiszellen von Klon 5/74/2 beobachtet (Abb.36, 37). Nach RIEGER et al. (1991) und HAGEMANN (1991) wird eine Kernteilung ohne Teilungsspindeln und Sichtbarwerden der Chromosomen als Amitose definiert, so dass es sich hier offenbar ebenfalls um Amitose handelt.

Amitose wurde meistens in kranken und kultivierten Tierzellen beobachtet (WILSON & LEDUC 1950; BUCHER 1959; BARTOS 1965; WARNKE 1982; CHEN & WAN 1986; DAVID & UERLINGS 1992; BHATTATHIRI 2001). In Pflanzenzellen wurden Amitosen auch von einigen Autoren in mutagenbehandelten Geweben von *Allium* (TORRE & MARTIN 1975), in Gewebekulturen (GU et al. 1991; ALTAMURA et al. 1991; 1993; VALENTE et al. 1998), und in spezialisierten Geweben wie dem Endosperm und Fruchtgewebe gefunden (KISSER 1922; MILLER 1980; MARCINIAK 1991). Die Kernschnürungen in den Epidermiszellen von Klon 5/74/2 können als Folge der ursprünglichen Mutagenbehandlung eingetreten sein.

Die gestörten Zell- und Kernteilungen wurden nur in Epidermiszellen von Klon 5/74/2 festgestellt. Allerdings können die gestörten Zellen bereits einige Mitosen durchlaufen haben, bevor es in den L1-bürtigen Zellen zu mehrkernigen Zellen oder Kernschnürungen kam, denn in einigen Sprossspitzen wurden polyploidisierte Zellen, jedoch keine mehrkernigen Zellen oder Zellen mit eingeschnürten Zellkernen gefunden (Abb. 15). Möglicherweise gehen diese Störungen der Zell- und Kernteilung auf eine oder mehrere Mutationen zurück, die Gene betreffen, die für den normalen Verlauf der Mitose verantwortlich sind. Der Zellzyklus wird durch eine Reihe von Genen gesteuert, die sowohl die geregelte Abfolge der einzelnen Teilungsphasen als auch die Genauigkeit der Replikation und Segregation der Chromosomen kontrollieren. Bestimmte Stoffwechselwege werden in diesem Zusammenhang als „Cell Cycle Checkpoints“ bezeichnet, wobei der Verlust von „Checkpoints“ zur Entregelung der Zellzykluskontrolle und als Folge dessen zu mitotischen Anomalien führt (ELLEDGE 1996). In der Epidermis von Klon 5/74/2 scheint die Mitose an mehreren Punkten gestört zu sein, denn es kommt zu Polyploidisierungen (Kapitel 3.1.4, 3.3.3), zu unregelmäßigen Verteilungen des Kernmaterials und zu eingeschnürten Zellkernen (Kapitel 3.4.2). So wurde die somatische Variabilität mit verschiedenen Ploidiestufen als Mixoploidie bezeichnet.

Die anomalen Mitosen, die zu mehrkernigen Zellen führen, und die Kernschnürungen sind ein Hinweis auf degenerative Prozesse in der Epidermis von Klon 5/74/2. Gestörte Mitosen

treten häufig nach Mutagenbehandlung auf, wie beispielsweise auch die Ergebnisse von STEIN (1926; 1927; 1930; 1936; 1942) zeigen. Sie erhielt bei experimenteller Auslösung von Mutationen mit Radiumstrahlen bei *Antirrhinum* vielseitig morphologisch veränderte Pflanzen. Sie waren gekennzeichnet durch Riesenzellen, Kernverschmelzung, multipolare Mitose, polyploide Mitose und Reduktionsmitose. Diese Abweichungen wurden unter dem Begriff Radiomorphologie zusammengefasst. Klon 5/74/2 zeigt zum Teil vergleichbare Abweichungen der Zellkernteilung, aber es ist noch unklar, wieso die Abweichungen erst mehrere Jahren nach der Mutagenbehandlung aufgetreten sind. Bemerkenswert ist auch, dass sich diese Mutation in einer Gewebeschnitt in chimärischer Konstitution erhalten lässt.

4.6 *Mediumoptimierung zur Kallusinduktion und Regeneration von Adventivsprossen bei Pelargonium zonale*

Bei der *in vitro*-Kultur adulter Gewebe von *Pelargonium zonale* werden schwarze Polyphenolverbindungen in das Medium ausgeschieden. Dadurch werden die Kallusinduktion oder das Gewebewachstum verhindert (HILDEBRANDT & HARNEY 1988; BAUER 1993; NEUMANN 1995; BOASE *et al.* 1998). In den vorliegenden Versuchen zeigt die Prüfung sechs verschiedener Substanzen bzw. Verfahren zur Verminderung der Polyphenolverbindungen, dass die Kombination von Perlit und anschließend PVP die beste Wirkung bei der Kallusinduktion und Sprossregeneration des *Pelargonium*-Gewebes hatte (Kapitel, 3.5.1, Abb. 38, Tab.18).

Bei den Wachstumsregulatoren zeigt TDZ die beste Wirkung zur Induktion von Kallus und zur Regeneration von Adventivsprossen bei *Pelargonium zonale* (Kapitel, 3.5.1, Tab. 19). Der Kallus wuchs auf dem TDZ-Medium schneller als bei allen anderen eingesetzten Wachstumsregulatoren. Das bestätigt die Beobachtung von VISSER *et al.* (1992), dass TDZ eine bessere Aktivität zur Induktion von Kallus als Auxin und Kinetin aufweist. Auf dem TDZ-Medium konnten nicht nur Kallus induziert, sondern auch Adventivsprosse ohne Mediumwechsel regeneriert werden. Ob die Adventivsprosse aus Kallus oder durch somatische Embryonen regenerieren, wurde nicht untersucht.

4.7 *Kompetenz der Zellen zur in vitro-Regeneration bei Pelargonium zonale*

Im Gegenzug stimmt die Konstitution der Adventivsprosse aus Blattstielsegmenten von 'Mrs. Pollock' weder mit der Beobachtung von BERGANN & BERGANN (1959), wobei die Genotype der Adventivsprossen mit den L3-Zellen identisch sind, noch mit den

Regeneraten aus Klon 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR in der vorliegenden Arbeit, wobei die Morphologie der Adventivsprossen mit L1-Zellen identisch ist (Kapitel, 3.5.2), überein, sondern sie ist heterogen (Kapitel, 3.5.3, Tab. 21; Abb. 39). Darüber hinaus entstanden auch chimärische Regenerate. Die an der *in vitro*-Regeneration beteiligten Zellen entstammen offensichtlich aus mindestens zwei Gewebeschichten der Explantate. Nachgewiesen werden konnte an 'Mrs. Pollock', dass sich die weiße L2-bürtige Zellen der GWG-Explantate und L3-bürtige Zellen der GGW-Explantaten an der Kallus- und Adventivsprossbildung beteiligen. Im Fall der GWG-Variante von 'Mrs. Pollock' kann keine Aussage getroffen werden, ob die grünen Adventivsprosse (85,9 %) von L1- und/oder L3-bürtigen Zellen abstammen.

Daher ist es anzunehmen, dass die Kompetenz von Zellschichten zur Regeneration von dem Zellgenotyp, der Zellposition, der Induktionsfähigkeit und der Anzahl der Zellen, die mit dem Kulturmedium in Kontakt gekommen sind, abhängt.

4.8 *In-vitro*-Regeneration von Chimären

KAMEYA (1975) erhielt bei Kulturen mit Protoplasten von chimärischem *Pelargonium* entweder grüne oder weiße Adventivpflanzen, jedoch wie BURK (1975) bei Tabak keine Chimären. CASSELLS et al. (1980) regenerierten nur homohistische Adventivpflanzen aus *Pelargonium*-Blattstielen. Daher sind einige Autoren der Ansicht, dass eine Adventivpflanze aus einer Zelle hervorgeht (BROERTJES & KEEN 1980; BROERTJES & VANHARTEN 1985; NONOHAY *et al.* 1999).

Jedoch beobachteten SKIRVIN & JANICK (1976) 0,6 % Chimären bei Kalluskulturen von *Pelargonium graveolens*. Aus *Saintpaulia ionantha* Gewebe konnten bis zu 34% Chimären regenerieren (LINEBERGER & DRUCKENBROD 1985). BERGANN & BERGANN (1959) erhielten bei *Pelargonium* 'Madame Salleron' und NORRIS et al. (1983) bei *Saintpaulia* aus chimärischen Blattgeweben ausschließlich sortentypische Regenerate. In der vorliegenden Arbeit wurden 10,8 % unterschiedliche chimärische Adventivsprosse aus den Geweben von 'Mrs. Pollock' regeneriert (Kapitel, 3.5.3, Abb. 40, Tab. 21), wobei nicht nur die ursprüngliche chimärische Konstitution, sondern auch 8,6 % neuartige chimärische Adventivsprosse beobachtet wurden.

Eine Reihe von Autoren interpretierte die Entstehung chimärischer Adventivsprosse entweder mit Mutation bei der Sprossentwicklung (BERGANN 1967; HESS 1991) oder

mit dem multizellulären Ursprung von Adventivsprossen (DULIEU 1967; OPATRŇY & LANDA 1974; SKENE & BARLASS 1983; MARCOTRIGIANO 1986), wo mehr als eine Ursprungszelle zur Adventivprossbildung beigeträgt (NORRIS et al., 1983; LINEBERGER & DRUCKENBROD, 1985). Die Prüfung der Abrissstellen der Blattstecklinge bei BERGANN & BERGANN (1959) spricht dafür, dass am Blattgrund des `Salleron`-Blattes bei der Sprossregeneration die drei obersten Schichten unaufgespalten und in ihrer ursprünglichen Anordnung in die neuen Scheiteln übernommen werden. Die multizelluläre Theorie wurde auch durch die Experimente von MARCOTRIGIANO & GOUIN (1984) unterstützt. Dabei wurden 0,3% – 0,4% chimärische Adventivprosse aus gemischtem Kalli mit unterschiedlichen Konstitutionen bei Tabak beobachtet.

Bei *Pelargonium zonale* `Mrs. Pollock` ist davon auszugehen, dass sich in der *in vitro*-Kultur in gewissem Maße (10,8 %) an den chimärischen Explantaten Mischkallus aus Zellen mit grünen Plastiden und Zellen mit weißen Plastiden bildete und beide Zelltypen sich auch an der Bildung eines Adventivsprosses beteiligen konnten (LI, 2005). Da beide Zelltypen sich im Adventivpross zufällig anordnen, konnten neuartige Chimären entstehen (8,6 %), die sich in ihrer Konstitution von Ausgangsvarianten unterschieden.

4.9 Somaklonale Variation der Adventivpflanzen aus *Pelargonium zonale*

Seit längerer Zeit ist es bekannt, dass *in vitro*-Kulturen, speziell Kalluskulturen, Regenerate hervorbringen können, die sich beträchtlich vom Ausgangsmaterial unterscheiden (BENNICI et al. 1968; BENNICI 1974; 1990; OGIHARA 1981; BIRADAR et al. 1993; KRIKORIAN et al. 1993; GILISSEN et al. 1993, 1994; SKIRVIN et al. 1994; NEUMANN 1995). Viele dieser Variationen zeigten sich an den regenerierten Pflanzen als vererbare Mutationen. Dieses Phänomen ist als somaklonale Variabilität bekannt (LARKIN & SCOWCROFT 1981). Somaklonale Variabilität ist von fast allen vegetativ vermehrten Nutzpflanzen seit längerem bekannt und ist anhand sogenannter `Sports` nachweisbar (RÖSSEL 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die *in vitro*-Kultur Explantate des dreifach markierten chimärischen Klons `Weißer Liebling`, DHH, GWG, WRR und des Klons 5/74/2 von *Pelargonium zonale* `Kleiner Liebling`, PHH aufgesetzt (Kapitel, 3.5.2; Kapitel, 3.5.4). Daher waren die Ausgangszellen für die *in vitro*-Kultur bei Klon `Weißer Liebling` diploid und haploid, und beim Klon 5/74/2 polyploid und haploid (Kapitel 3.3.3).

Die Stomatalängen der Adventivpflanzen wiesen aber darauf hin, dass Polyploidisierung und somit somaklonale Variation in der *in vitro*-Kultur auftrat. Die Ploidiestufe der Stomata lag in den Adventivpflanzen aus DHH- sowie aus PHH-Geweben überwiegend im diploiden Bereich (Kapitel 3.5.2, 3.5.4, Tab. 20, 22, 23). Das heißt, dass das Phänomen der Diploidisierung in der Sprossregeneration auftritt. Das Phänomen der Diploidisierung stimmt jedoch weder mit der Definition der „diplontische Selektion“ noch mit der „diplontische Drift“ von BALKEMA (1971, 1972) überein. Dabei wurden auch tetraploide, oktoploide und Pflanzen mit verschiedenen Ploidiestufen gefunden. Das ist ähnlich wie bei der Untersuchung von BENNICI (1990).

BENNICI (1974) fand bei der cytologischen Analyse von Regeneraten von 'Kleiner Liebling' einen Stabilitätsverlust der Chromosomenzahl des Kallus während der Zelldifferenzierung. Die Chromosomenvariabilität in somatischen Zellen nach der Regeneration hängt mit dem Valenzzustand des Kallus zusammen (OGIHARA 1981). Die regenerierten Adventivpflanzen zeigten weniger Chromosomenvariabilitäten als der Kallus (ORTON 1980). Das weist darauf hin, dass eine Zellselektion bei der Regeneration von Kallus stattfindet. Die Stärke der Selektion ist von der Art des Explantates abhängig (MOK et al. 1976; OGIHARA 1981).

SWARTZ (1991) berichtete, dass sowohl hoch polyploide als auch haploide Zellen gegenüber diploiden eine geringere Fähigkeit zur Organbildung aufweisen. Die diploiden Pflanzen wachsen schneller als die anderen (BALKEMA 1972; RUTH et al., 1985). Nach SINGH (1975) wurden auf B5-Medium diploide und auf MS-Medium tetraploide Regenerate bei *Haplopappus gracilis* selektiert.

So ist es denkbar, dass durch die Kultur Mutation und Selektion zur somaklonalen Variation und zur Phänomen der Diploidisierung bei der Sprossregeneration *in vitro*-Kultur in der vorliegenden Arbeit beitragen. Das heißt, dass diploide Zellen des DHH-Gewebes vom Klon 'Weißer Liebling' und diploidisierte haploide Zellen der PHH-Gewebe der Pflanzen von Klon 5/74/2 bevorzugt regenerieren. Damit gingen die polyploiden und haploiden Zellen aus den Geweben von Klon 5/74/2 durch eine Selektion in der *in vitro*-Kultur verloren. So wurden die annähernd gleichen Ploidiestufenraten der Adventivpflanzen aus der DHH- und PHH-Gewebekultur in vorliegendem Experiment verursacht (Tab. 23). Die tetraploiden und ploidiegemischten Adventivpflanzen sind möglicherweise wie bei Untersuchungen von OGIHARA (1981) und von ARNI & HERTNE (1997) durch

Ploidiemutation während der *in vitro*-Kultur entstanden. Die über *in vitro*-Kultur induzierte Polyploidie und Aneuploidie ist direkt abhängig von der Herkunft der Zellen, der Wachstumsphase, den Initialzellen der Explantate und dem Kulturmedium sowie den Kulturbedingungen (CASSELLS 1985; NASSOUR *et al.* 2003; SAITO *et al.* 2003).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den morphologischen und cytologischen Anomalien eines durch Mutagenbehandlung entstandenen Klon der haploiden Sorte 'Kleiner Liebling' von *Pelargonium zonale*. Dieser Klon 5/74/2 ist morphologisch auffällig, weil er gekräuselte und stark behaarte Blätter hat. Weiterhin treten unregelmäßig stark vergrößerte Epidermiszellen auf. Es wurde ein Rückschlag zu normalen diploiden Sports beobachtet.

In *Pelargonium zonale* hat die Zellgröße mit der Ploidiestufe der Zellen eine sehr hohe positive Korrelation, deshalb kann die Ploidiestufe der Zellen mit Hilfe der Zellgröße indirekt abgeschätzt werden. An histologischen Schnitten wurde die Ploidiestufe der Zellen in verschiedenen Schichten von Cytochimären durch Chromosomenzählung direkt bestimmt. An mit Toluidinblau gefärbten Präparaten wurde nicht nur die Chromosomenzahl festgestellt, es wurden auch Spindelapparate und verschiedene Kern- bzw. Zellteilungsstadien beobachtet. Die maximale Nukleolienzahl war als Parameter zur Bestimmung der Ploidiestufen der Zellen in *Pelargonium zonale* nicht geeignet.

Durch Bestimmung der Zellgrößen und Chromosomenzählung wurde festgestellt, dass die Epidermis in den Blättern vom Klon 5/74/2 verschiedene Ploidiestufen aufweist. Die Untersuchungen wiesen daraufhin, dass die somatische Variabilität der Epidermis vom Klon 5/74/2 bei *Pelargonium zonale* offenbar nicht nur auf einem einmaligen Akt im Sprossscheitel zu führen ist, sondern auch häufig, unabhängig und extra-apikal stattfindet. Solche Variabilität trat in den L2- und L3-bürtigen Zellschichten nicht auf. Somit wurde hier erstmals eine Periklinalcytochimäre mit variierender Epidermis bei *Pelargonium* beobachtet. Die somatische Variabilität mit verschiedenen Ploidiestufen hängt mit dem Wachstum des Gewebes zusammen.

Die Pflanzen mit stark behaarten und gekräuselten Blättern von Klon 5/74/2 waren nicht stabil. Sie trieben Sprosse mit behaarten oder gekräuselten Blättern oder Sprosse mit glatten Blättern und kurzen Haaren aus. Die Epidermis des gekräuselten oder behaarten Blattes war wie die des typisch behaarten und gekräuselten Blattes von Klon 5/74/2 variierend. Die Epidermiszellen der meisten Pflanzen mit glatten und kurzhaarigen Blättern lagen im diploiden Bereich. Die morphologische Besonderheit (Kräuselung und Behaarung) scheint mit dem Auftreten der extremen somatischen Variabilität in der Epidermis von Klon 5/74/2 in Zusammenhang zu stehen.

Histologische Untersuchungen zeigen zwei unterschiedliche Varianten von L1-Zellen in Sprossscheiteln von Klon 5/74/2: Bei einer Variante wird davon ausgegangen, dass die Zellen der L1 bereits im Sprossscheitel polyploidisiert sind. Die Polyploidisierung setzt sich beim Wachstum des Blattes in der Epidermis fort. Bei der zweiten Variante sind die Zellen der L1 im Sprossscheitel haploid und polyploide Zellen treten erst während der Blattentwicklung in der Epidermis auf.

In der Epidermis von Klon 5/74/5 wurden cytologische Anomalien beobachtet. Es traten anomale Mitosen mit irregulären Anordnungen und Verteilungen der Chromosomen (multipolare Mitose) auf. Darüber hinaus wurden mehrkernige Zellen gefunden, die vermutlich ein Resultat der gestörten Chromosomenverteilungen sind. Außerdem wurden eingeschnürte Zellkerne beobachtet. Die Anomalien der Mitose sind wahrscheinlich eine Folge der ursprünglichen Mutagenbehandlung der Ausgangspflanze, wobei Gene betroffen sein müssen, die den Zellzyklus regulieren.

Es ist gelungen, Adventivpflanzen mit Hilfe verbesserter Methoden aus Kallus von adulten Geweben von *Pelargonium zonale* in der *in vitro*-Kultur zu regenerieren. Dabei zeigte die Kombination von Perlit und anschließend PVP die beste Wirkung gegen die Bildung von Polyphenolverbindungen in der Gewebekultur von *Pelargonium*. TDZ ist einer der effektivsten Wachstumsregulatoren für die Kallusinduktion und Regeneration von Adventivsprossen bei *Pelargonium zonale*.

Der Genotyp der Adventivpflanzen aus dem dreifach markierten Chimärengewebe des Klons 'Weißer Liebling', DHH, GWG, WRR stimmte mit dem Genotyp der L1-Zellen überein. Somaklonale Variation wurde jedoch beobachtet. Die Stomatagrößen der Adventivpflanzen aus Klon 5/74/2 lagen wie bei 'Weißer Liebling' meistens im diploiden, selten im tetraploiden und gemischten Bereich. Die haploiden Zellen der kultivierten Geweben beteiligten sich nicht an der Regeneration.

Aus chimärischen Blattstielen von GWG- und GGW-Varianten von *Pelargonium zonale* 'Mrs. Pollock' wurden 10,8 % chimärische Adventivsprosse (GGW, GWG und Sektorialchimären) regeneriert. Davon sind 8,6 % der Chimären unterschiedlich von der Konstitution der Ausgangsexplantate. Aus der GGW-Variante wurden mehr Chimären als aus der GWG-Variante regeneriert. Die Zellen zur Kallusinduktion und Adventivsprossregeneration entstammten mindestens zwei unterschiedlichen Gewebeschichten.

6 Literaturverzeichnis

Abak, 1998:

K. Abak, N. Cömlekcioglu, S. Büyükalaca, N. Sari: Use of stomatal characteristics to estimate ploidy level of haploid and dihaploid pepper plants, Tenth EUCARPIA Meeting Capsicum and Eggplant, Avignon, France, 1998, S. 179-182.

Adaniya, 1994:

Shinichi Adaniya, Ardian: A new method for selecting cytochimeras by the maximum number of nucleoli per cell in *Allium wakegi* Araki and *A. fistulosum* L., *Euphytica*, 1994, 79, S. 5-12.

Alberts, 1989:

B. Alberts, D. Bray: *Molekulare Biologie der Zellen*, Wiley VCH. 1989, 2, 638-652

Alieva, 1991:

I. B. Alieva, I. A. Vorobjev: Induction of multipolar mitoses in cultured cells: decay and restructuring of the mitotic apparatus and distribution of centrioles, *Chromosoma*, 1991, 100, S. 532-542.

Altamura, 1991:

M.M. Altamura, F. Capitani, D. Serafini-Fracassini, P. Torrigiani, G. Falasca: Root histogenesis from tobacco in thin cell layers, *Protoplasma*, 1991, 161, S. 31-42.

Altamura, 1993:

M. M. Altamura, F. Capitani, G. Falasca, N. Bagni: Cytological events induced by the inhibition of polyamine biosynthesis in thin cell layers of tobacco, *Protoplasma*, 1993, 175, S. 9-16.

Anonymous, 1978:

Anonymous: In vitro multiplication of woody species. Round Table Conf., Gembloux, Belgium: Centre Rech. Agron. Etat, 1978, S. 1-293.

Arni, 1997:

Peter Arni, Thomas Hertner: Chromosomal aberrations in vitro induced by aneugens, *Mutation Research*, 1997, 379, S. 83-93.

Badr, 1971:

M.; Badr, W. Horn: Cytologische und genetische Untersuchungen bei *Pelargonium zonale* - Hybriden, *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 1971, 66, S. 158-172.

Bajaj, 1991:

Y. P. S. Bajaj: Automated micropropagation for the mass production of plants, In: Y. P. S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, Berlin, 1991, S. 3-16

Balkema, 1971:

G. H. Balkema: Chimerism and diplontic selection, PhD., Landlouw hogeschool, 1971.

Balkema, 1972:

G. H. Balkema: Diplontic drift in chimeric plant, *Radiation Botany*, 1972, 12, S. 51-55.

Barton, 1993:

M. K. Barton, R. S. Poethig: Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant, *Development*, 1993, 119, S. 823-831.

Bartos, 1965:

F. Bartos: The function of the cytocentrum in amitosis, *Biologia*, 1965, 20, S. 873-876.

Bateson, 1916:

W. Bateson: "Root-Cuttings, chimeras and 'Sports'", *Journal of Genetics*, 1916, 6, S. 75-80.

Bateson, 1926:

W. Bateson: Segregation, *Journal of Genetics*, 1926, 16, S. 201.

Bauer, 1993:

H. Bauer: Identification of 'flower-sports' of *Pelargonium* and roses by phenolic compounds, *Gartenbauwissenschaft*, 1993, 58, S. 82-89.

Baur, 1909:

E. Baur: Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der „*Varietates albomarginatae hort.*“ von *Pelargonium zonale*, *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 1909, 1, S. 330-351.

Bennici, 1968:

A. Bennici, M. Buiatti, F. D'Amato: Nuclear conditions in haploid *Pelargonium* in vivo and in vitro, *Chromosoma*, 1968, 24, S. 194 - 201.

Bennici, 1974:

A. Bennici: Cytological analysis of roots, shoots and plants regenerated from suspension and solid in vitro cultures of haploid *Pelargonium*, *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 1974, 72, S. 199-205.

Bennici, 1990:

A. Bennici: Somaclonal Variation in *Pelargonium*. In Y. P. S. Bajaj (ed.), *Somaclonal Variation in crop improvement 1*, In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, Heidelberg, 1990, S. 541-561

Bergann, 1959:

F. Bergann, L. Bergann: Über experimentell ausgelöste vegetative Spaltungen und Umlagerungen an chimärischen Klone, zugleich als Beispiele erfolgreicher Staudenauslese, 1. *Pelargonium zonale* Ait. 'Madame Salleron', *Der Züchter*, 1959, 29, S. 361 -374.

Bergann, 1960:

F. Bergann, L. Bergann: Über die sogenannte Kräuselkrankheit der *Poinsettia* und die Beteiligung des "Dermatogens" bei der Mesophyllbildung, *Flora*, 1960, 149, S. 331-344.

Bergann, 1961:

F. Bergann: Eine weitere Trichimäre bei *Euphorbia pulcherrima* Willd., *Biologisches Zentralblatt*, 1961, 4, S. 403-411.

Bergann, 1962:

F. Bergann, L. Bergann: Über Umschichtungen (Translokation) an den Sprossspitzen periklinaler Chimären, *Züchter*, 1962, 32, S. 110-119.

Bergann, 1967:

F. Bergann: Mutations-Chimären: Rohmaterial züchterischer Weiterbehandlung, Umschau, 1967, 24, S. 791-797.

Bergervoet, 1996:

J.H.W. Bergervoet, H.A. Verhoeven, L.J.W. Gilissen, R.J. Bino: High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp, Plant Science, 1996, 116, S. 141–145.

Bhattathiri, 2001:

V. N. Bhattathiri: Amitotic cell divisions and tumour growth: an alternative model for cell kinetic compartments in solid tumours, Oral Oncology, 2001, 37, S. 288-295.

Bingham, 1968:

E. Bingham: Stomatal chloroplast in alfalfa at four ploidy levels, Crop Science, 1968, 8, S. 509-511.

Biradar, 1993:

D. P. Biradar, A. Lane Rayburn, D. G. Bullock: Endopolyploidy in Diploid and Tetraploid Maize (*Zea mays* L.), Annals of Botany, 1993, 71, S. 417-421.

Boase, 1998:

M. R. Boase, J. M. Bradley, N. K. Borst: An improved method for transformation of regal Pelargonium (*Pelargonium x domesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Science, 1998, 139, S. 59-69.

Bridg, 1993:

H. Bridg: Development of methods for in vitro culture of *Annona* species with special reference to Colombia. Project reports DAAD, Berlin, Humboldt Universität zu Berlin, 1993, S. 16.

Broertjes, 1968:

C. Broertjes, B. Haccius, S. Weidlich: Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding, Euphytica (Historical Archive), 1968, 17, S. 321 - 344.

Broertjes, 1980:

C. Broertjes, A. Keen: Adventitious shoot: do they develop from one cell?, Euphytica, 1980, 29, S. 73-87.

Broertjes, 1985:

C. Broertjes, A.M. Vanharten: Single cell origin of adventitious buds, Euphytica, 1985, 34, S. 93-95.

Brown, 1974:

W. V. Brown, E. M. Bertke: Textbook of cytology, C.V. Mosby CO. 1974.

Brown, 1991:

S.C. Brown, P. Devaux, D. Marie, C. Bergounioux, P.X. Petit: Cytométrie en flux: Application à l'analyse de la ploidie chez les végétaux, Biofuture, 1991, 105, S. 2-16.

Bryans, 1985:

C. Bryans, D. L. Schmith: Endopolyploidy, cell volume and nuclear volume interrelationships in cotyledons of the Leguminosae, Annals of Botany, 1985, 55, S. 225-235.

Bucher, 1959:

O. Bucher: Amitose der tierischen und menschlichen Zelle, *Protoplastologia*, 1959, S. 1-156

Burk, 1964:

L.G. Burk, RN Stewart, H. Dermen: Histogenesis and genetics of a plastid-controlled chlorophyll variegation in tobacco, *American Journal of Botany*, 1964, 51, S. 713-724.

Burk, 1975:

L. G. Burk: Clonal and selective propagation of tobacco from leaves, *Plant Science Letter*, 1975, 4, S. 149-154.

Carpenter, 1995:

R Carpenter, ES Coen: Transposon induced chimeras show that *floricaula*, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers, *Development*, 1995, 121, S. 19-26.

Cassells, 1980:

A. C. Cassells, G. Minas, R. Long: Culture of *Pelargonium* hybrids from meristems and explants: chimeral and beneficially-infected varieties. In D. Ingram, and J. Helgeson (eds.), *Tissue culture methods for plant pathologists*, Blackwell, Oxford, 1980, S. 125-131

Cassells, 1983:

A.C. Cassells, G. Minas: Beneficially-infected and chimeral *Pelargonium*: Implications for micropropagation by meristem and explant culture, *Acta Horticulture*, 1983, 131, S. 287-297.

Cassells, 1985:

A.C. Cassells: Genetic, epigenetic and non-genetic variation in tissue culture derived plants. In A. Schafer-Menuhr (ed.), *In Vitro Techniques, Propagation and Long Term Storage*, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, 1985, S. 111-120.

Cassells, 1995:

A. C. Cassells, C. J. Barrett, B. F. Canney: Creation of variability in *Pelargonium x domesticum* by hybridisation of stable with unstable genotypes and enhancement of expression of instability in the hybrids by adventitious regeneration in vitro, *Acta Horticulturae*, 1995, 420, S. 81-85.

Chen, 1986:

Y. Q. Chen, B. K. Wan: A study on amitosis of the nucleus of the mammalian cell. I. A study under the light and transmission electron microscope, *Acta Anatomy*, 1986, 127, S. 69-76.

Chittenden, 1926:

R. J Chittenden: Studies in Variegation. II. *Hydrangea* and *Pelargonium*, *Journal of Genetica*, 1926, 16, S. 43-61.

Chittenden, 1927:

R. J Chittenden: Vegetative Segregation, *Bibliographia Genetica*, 1927, 3, S. 355-442.

Croke, 1997:

J. T Croke, AC Cassells: Dark induction and genetic stability of somatic embryos of zonal geraniums (*Pelargonium x hortorum* Bailey), *Journal of Applied Botany*, 1997, 71, S. 119-124.

D'Amato, 1964:

F. D'Amato: Endopolyploidy as a factor in plant tissue development, *Caryologia*, 1964, 17, S. 41-52.

D'Amato, 1984:

F. D'Amato: Role of Polyploidy in reproductive Organs. B. Johr, (ed.), Embryology of angiosperms, Berlin, Springer Verlag, 1984, S. 519-566.

D'Amato, 1989:

F D'Amato: Polyploidy in cell differentiation., Caryologia, 1989, 42, S. 183-211.

Daker, 1966:

M. G. Daker: 'Kleine Liebling', a haploid cultivar of Pelargonium, Nature, 1966, 211, S. 549-550.

Daker, 1967:

M.G. Daker: Cytological studies on a haploid cultivar of Pelargonium and its colchicine induced diploids, Chromosoma, 1967, 21, S. 251-271.

David, 1992:

H. David, I. Uerlings: Ultrastructure of amitosis and mitosis of the liver, Zentralblatt für Pathologie, 1992, 138, S. 278-283.

De Graf, 1968:

A. B. De Graf: Exotica 3. Pictorial cyclopedia of exotic plants, Rutherford, Roehrs Comp, Rutherford, 1968.

De Rocher, 1990:

E.J. De Rocher, David, K. R. Harkins, W. Gallbraith, H. J. Bohnert: Developmentally Regulated Systemic Endopolyploidy in succulents with small Genomes, Science, 1990, 250, S. 99-101.

Dore', 1986:

C. Dore': Evaluation du niveau de ploidie des plantes d'une population de choux de Bruxelles (Brassica oleracea L. ssp. gemmifera) d'origine pollinique, Agronomie, 1986, 6, S. 797-801.

Dulieu, 1967:

H. Dulieu: Sur les differnts types de mutation extranucleairies induites par le methane sulfonate dethyle chez nicotiana tabacum L., Mutation Research, 1967, 4, S. 177-189.

Eckley, 1997:

D. M. Eckley, A. M. Ainsztein, A. M. Mackay, Ilya G. Goldberg, W. C. Earnshaw: Chromosomal Proteins and Cytokinesis: Patterns of Cleavage Furrow Formation and Inner Centromere Protein Positioning in Mitotic Heterokaryons and Mid-anaphase Cells, Journal of Cell Biology, 1997, 136, S. 1169-1608.

Elledge, 1996:

S. J. Elledge: Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis, Science, 1996, 24, S. 1664-1672.

Fletcher, 2000:

J. C. Fletcher, Elliot M. Meyerowitz: Cell signaling within the shoot meristem, Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3, S. 23-30.

Fletcher, 2002:

J. C. Fletcher: Coordination of cell proliferation and cell fate decisions in the angiosperm shoot apical meristem, BioEssays, 2002, 24, S. 27-37.

Franco, 1939:

C. Franco: Relation between chromosome number and stomata in coffea, Botanical Gazette, 1939, 100, S. 817-827.

Galbraith, 1991:

D. W. Galbraith, K. R. Herkins, S. Knapp: Systemic Endopolyploidy in Arabidopsis thaliana., Plant physiology, 1991, 96, S. 985-989.

Gamborg, 1968:

O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima: Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells, Experiment of Cell Research, 1968, 50, S. 150-158.

Geitler, 1953:

L. Geitler: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung, Protoplasmatologia, Kern-und Zellteilung C, 1953, VI.

Gifford, 1971:

Jr E. M. Gifford, G. E. Jr Corson: The shoot apex in seed plants, Botanical Review., 1971, 37, S. 143-229.

Gilissen, 1993:

L. J. W. Gilissen, M. J. van Staveren, J. Creemers-Molenaar, H. A. Verhoeven: Development of polysomaty in seedlings and plants of Cucumis sativus L., Plant Science, 1993, 91, S. 171-179.

Gilissen, 1994:

L. J. W. Gilissen, M. J. van Staveren, J. C. Hakkert, M. J. M. Smulders, H. A. Verhoeven, J. Creemers-Molenaar: The competence of cells for cell division and regeneration in tobacco explants depends on cellular location, cell cycle phase and ploidy level, Plant Science, 1994, 103, S. 81-91.

Giménez-Abián, 1998:

M.I. Giménez-Abián, L. Utrilla, J.L. Cánovas, G. Giménez-Martin, M.H. Navarrete, C.D.L. Torre.: The positional control of mitosis and cytokinesis in higher-plant cells, Planta, 1998, 204, S. 37-43.

Glover, 1996:

D. M. Glover, H. Ohkura, A. Tavares: Polo Kinase: The Choreographer of the mitotic stage?, Journal of Cell Biology, 1996, 135, S. 1691-1684.

Grafi 1995:

G. Grafi, B. A. Larkins: Endoreduplication in Maize Endosperm: Involvement of M Phase-Promoting Factor Inhibition and Induction of S Phase-Related Kinases, Science, 1995, 269, S. 1262-1264.

Grafi, 1998:

G. Grafi: Cell Cycle Regulation of DNA Replication: The Endoreduplication Perspective, Experimental Cell Research, 1998, 244, S. 372-378.

Gu, 1991:

Shu-Rong; Gu, Yao-Lin; Gui, Shu-Qiong Liu: Suspension culture of endosperm callus cell and amitosis in vitro, Acta-Botanica-Sinica (China), 1991, 33, S. 478-481.

Hagemann, 1991:

R. Hagemann: Allgemeine Gentechnik. Jena, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991, 3. Auflage,

Hagemann, 2000:

R. Hagemann: Erwin Baur: Pionier der Genetik und Züchtungsforschung, Roman Kovar Verlag, 2000, 60-97.

Hänsch, 2001:

Klaus-Thomas Hänsch: Induktion und Steuerung der somatischen Embryogenese bei Pelargonium-Hybriden, Dissertation, Universität Hannover, 2001.

Hervas, 1975:

J. P. Hervas: Multipolar effect of vinblastine on cell division in *Allium cepa* L., *Experimentia*, 1975, 31, S. 170-172.

Hervas, 1987:

J. P. Hervas: Multinucleate Plant cells III. Nuclear aneuploidy and mitotic Behavior., *Experimental Cell Research*, 1987, 171, S. 436-447.

Hess, 1991:

Dieter Hess: Biotechnologie der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1991, 138-139

Hildebrandt, 1988:

V. Hildebrandt, P. M. Harney: Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, Bailey 'Sprinter Scarlet'. *HortScience*, 1988, 63, S. 651-657.

Howard, 1978:

H. W. Howard: The contribution of growing point layers L1, L2, and L3 to potato leaves, *Potato Research*, 1978, 21, S. 31-34.

Huala, 1993:

E. Huala, Lan M. Sussex: Determination and cell interaction in reproductive meristems, *The Plant Cell*, 1993, 5, S. 1157-1165.

Hutchinson, 1996a:

M. J. Hutchinson, P. K. Saxena: Role of purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures., *Physiologia Plantarum*, 1996a, 98, S. 517-522.

Hutchinson, 1996b:

M. J. Hutchinson, P. K. Saxena: Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures, *Plant Cell Reports*, 1996b, 15, S. 512-515.

Hutchinson, 1997:

M. J. Hutchinson, S. KrishnaRaj, P. K. Saxena: Inhibitory effect of GA3 on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures, *Plant Cell Reports*, 1997, 16, S. 435-438.

Jordan, 1991:

M. Jordan, L. Iturriaga, C. Roveraro, A. Coreux: Promotion of *Annona cherimola* in vitro shoot morphogenesis as influenced by antioxidants, *Gartenbauwissenschaft*, 1991, 56, S. 224-227.

Jörgensen, 1927:

C. A. Jörgensen, M. B. Crane: Formation und morphology of solanum chimeras, *Journal of Genetics*, 1927, 18, S. 247-273.

Kameya, 1975:

T. Kameya: Culture of Protoplast from chimeral plant tissue of nature, *Japanese Journal of Genetics*, 1975, 30, S. 417 - 420.

Keryer, 1984:

G. Keryer, H. Ris, G. G. Borisy: Centriole distribution during tripolar mitosis in chinese hamster ovary cells, *Journal of Cell Biology*, 1984, 98, S. 2222-2229.

Kisser, 1922:

J. Kisser: Amitose, Fragmentierung und Vacuolisierung pflanzlicher Zellkerne, *Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse*, 1922, 131, S. 105-128.

Köhler, 1992:

W. Köhler, G. Schachtel, P. Voleske: Biostatistik: Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler, Berlin, Springer Lehrbuch, Berlin, 1992.

Krikorian, 1993:

A. D. Krikorian, H. Irizarry, S. S. Cronauer-Mitra, E. Rivera: Clonal Fidelity and Variation in Plantain (Musa AAB) Regenerated from Vegetative Stem and Floral Axis Tips in vitro, *Annals of Botany*, 1993, 71, S. 519-535.

KrishnaRaj, 1997:

S. KrishnaRaj, Yong-Mei Bi, P. K. Saxena: Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. 'Frensham'), *Planta*, 1997, 201, S. 434-440.

Kudo, 2001a:

N. Kudo: Patterns of Endopolyploidy During Seedling Development in Cabbage (*Brassica Oleracea* L.), *Annals of Botany*, 2001a, 87, S. 275-281.

Kudo, 2001b:

N. Kudo, Y. Kimura: Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some *Brassica* species, *Theoretical and Applied Genetics*, 2001b, 102, S. 104–110.

Kutzner, 1980:

H. Kutzner: Die multipolare Mitose: Lebendbeobachtungen und cytophotometrische Untersuchungen an mehrkernigen Zellen aus der Gewebekultur. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität, 1980.

Larkin, 1981:

P.J. Larkin, W.R. Scowcroft: Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures, *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, 60, S. 197–214.

Li, 2005:

Ming-Yin Li: Observation of High-Frequency Occurrence of Chimeral Adventitious Shoots in Tissue Culture from the Chimeral Tissues of *Pelargonium zonale*, *HortScience* (in press), 2005.

Liebau, 1988:

E. Liebau: Untersuchungen zur Sproßvariation durch Mutation und Chimärenumlagerung in einem haploiden *Pelargonium*-Klon, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 1988.

Lineberger, 1985:

R.D. Lineberger, M. Druckenbrod: Chimeral nature of the pinwheel flower african violets (*Sainpaulia*. Gesneriaceae), *American Journal of Botany*, 1985, 78, S. 1204-1212.

Lorz, 1947:

A.P. Lorz: Supernumerary chromosomal reproduction: polytene chromosomes, endomitosis, multiple chromosome complexes, polysomaty, *Botanical Review*, 1947, 13, S. 597–624.

Marciniak, 1991:

K. Marciniak: Cytophotometric analysis of amitosis in nuclear endosperm of *Vicia faba*, *Folia Histochemical Cytobiology*, 1991, 29, S. 67-69.

Marcotrigiano, 1984:

M. Marcotrigiano, F.R. Gouin: Experimentally synthesized plant chimeras¹, In vitro recovery of *Nicotiana tabacum* L. chimeras from mixed callus cultures, *Annals of Botany*, 1984, 54, S. 503-511.

Marcotrigiano, 1984:

M. Marcotrigiano, R.N. Stewart: All variegated plants are not chimeras, *Science*, 1984, 223, S. 505.

Marcotrigiano, 1986:

M. Marcotrigiano: Origin of adventitious shoots regenerated from cultured tobacco leaf tissue, *American Journal of Botany*, 1986, 73, S. 1541-1547.

Marcotrigiano, 1995:

M. Marcotrigiano, R. Bernatzky: Arrangement of cell layers in the shoot apical meristems of periclinal chimeras influences cell fate, *Plant Journal*, 1995, 7, S. 193–202.

Marsolais, 1991:

A.A. Marsolais, D.P.M. Wilson, M.J. Tsujita, T. Senaratna: Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and Regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium, *Canadian Journal of Botany*, 1991, 69, S. 1188-1193.

Mayzel, 1875:

W. Mayzel: Über eigenthümliche Vorgänge bei der Theilung der Kerne in Epithelialzellen., *Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften*, 1875, 13, S. 849-852.

Melaragno, 1993:

J. E Melaragno, Mehrtra B, Coleman AW: Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 1993, 5, S. 1661-1668.

Miller, 1980:

R. H. Miller: Amitosis and Endocytogenesis in the fruit of *Malus sylvestris*, *Annals of Botany*, 1980, 46, S. 567 - 575.

Mishra, 1997:

M.K. Mishra: Stomatal Characteristics at Different Ploidy Levels in *Coffea* L., *Annals of Botany*, 1997, 80, S. 689-692.

Mithila, 2001:

J. Mithila, S. J. Murch, S. KrishnaRaj, P. K. Saxena: Recent advances in *Pelargonium* in vitro regeneration systems, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, 67, S. 1-9.

Mithila, 2003:

J. Mithila, J. C. Hall, J. M. R. Victor, P. K. Saxena: Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.), *Plant Cell Reports*, 2003, 21, S. 408–414.

Mok, 1982:

M. C. Mok, D. W. S. Mok, D. J. Armstrong, K. Shudo, Isogai Y., Okamoto, T: Cytokinin activity of N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*, 1982, 21, S. 1509 – 1511.

Murashige, 1962:

T. Murashige, F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 1962, 15, S. 473-497.

Murthy, 1996:

B. N. S. Murthy, R. P. Singh, P. K. Saxena: Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium* × *hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) cotyledonary cultures, *Plant Cell Reports*, 1996, 15, S. 423-426.

Murthy, 1999:

B. N. S. Murthy, N. N. Vettakkorumakankav, S. KrishnaRaj, J. Odumeru, P. K. Saxena: Characterization of somatic embryogenesis in *Pelargonium* × *hortorum* mediated by a bacterium, *Plant Cell Reports*, 1999, 18, S. 607-613.

Nassour, 2003:

M. Nassour, G. Chasseriaux, N. Dorion: Optimization of protoplast-to-plant system for system for *Pelargonium* × *Hortorum* 'Alain' and genetic stability of the regenerated plants, *Plant Science*, 2003, 165, S. 121-128.

Nemec, 1926:

B. Nemec: Multipolare Teilungsfiguren und vegetative Chromosomenreduktion, *Biologische Genetik*, 1926, 2, S. 96-103.

Neumann, 1995:

K. H. Neumann: Pflanzliche Zell- und Gewebekultur, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1995,

Nonohay, 1999:

J. S.; Nonohay, J. E. A. Mariath, H. Winge: Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare*, Poaceae., *Plant Cell Reports*, 1999, 18, S. 929-934.

Norris, 1983:

R. E. Norris, R. H. Smith, K. C. Vaughn: Plant chimeras used to establish the de novo origin of shoots, *Science*, 1983, 220, S. 75 - 76.

Ogihara, 1981:

Y. Ogihara: Tissue culture in *Haworthia*: part 4; genetic characterization of plants regenerated from callus, *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, 60, S. 353-363.

Olbricht, 1998:

K. Olbricht: Untersuchungen zur genetischen und histogenetischen Variabilität an transgenen *Petunia hybrida* Hort. (Vilm.), Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1998.
<http://dochostrz.hu-berlin.de/dissertationen/agrar/olbricht-klaus/>

Opatrný, 1974:

Z. Opatrný, Z. Landa: Regeneration of chlorophyll chimeras from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L., *Biologia Plantarum* (Praha), 1974, 16, S. 312-315.

Orton, 1980:

T. J. Orton: Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum*, *Theoretical and Applied Genetics*, 1980, 56, S. 101-112.

Pera, 1969:

F. Pera, H. G. Schwarzacher: Die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellkerne multipolarer Mitose in euploiden Gewebekulturen *Microtus agrestis*, *Chromosoma*, 1969, 26, S. 337-354.

Pera, 1973:

F. Pera, B. Rainer: Studies of multipolar mitoses in euploid tissue cultures, I. Somatic reduction to exactly haploid and triploid chromosome sets, *Chromosoma*, 1973, 42, S. 71-86.

Pierik, 1989:

R.L.M. Pierik: *In vitro* culture of higher plants, Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands, 1989, 79-82

Pierik, 1997:

R. L. M. Pierik: *In vitro* culture of higher plants, Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1997,

Plaschil, 1997:

S. Plaschil: Vergleichende Untersuchungen zur histogenetisch bedingten Sternmusterbildung in der Petalenfärbung bei *Camellia* L., *Myosotis* L., *Pelargonium* L'Herit. ex Ait., *Phlox* L., *Rhododendron* L., *Saintpaulia* H. WENDL. *Verbena* L., Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin, 1997. <http://dochoost.rz.hu-berlin.de/dissertationen/agrar/plaschil-sylvia/>

Poethig, 1984:

RS. Poethig: Patterns and problems in angiosperm leaf morphogenesis, Macmillan Pub. Co. N. Y., 1984, 413-432.

Pohlheim 1972:

F. Pohlheim, E. Pohlheim, G. Günther: Die haploide *Pelargonium* zonale 'Kleiner Liebling' als Testsystem für Mutagene, *Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule Potsdam*, 1972, 16, S. 65-70.

Pohlheim, 1974:

F. Pohlheim, E. Pohlheim: Über Vergilbungsmuster der Blätter von *Crataegomespilus dardarii* und Sprossvarianten von *Pelargonium* zonale "Kleiner Liebling", *Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule Potsdam*, 1974, 18, S. 47-55.

Pohlheim, 1977:

F Pohlheim: Umlagerung an der Trichimäre *Pelargonium* zonale -'Freak of nature' - ein Beitrag zur Herstellung von Plastommutation, *Wissenschaftliche Zeitschrift der Pädagogischen Hochschule Potsdam Math.-Naturw. Reihe*, 1977, 21, S. 115-127.

Pohlheim, 1978:

E. Pohlheim: Untersuchungen zur Mutationsauslösung und Mutagenitätstestung an einem monohaploiden Klon von *Pelargonium* zonale (L.) L'Herit. ex. Ait. Dissertation, Pädagogische Hochschule "Karl Liebknecht" Potsdam, 1978.

Pohlheim, 1983:

Vergleichende Untersuchungen zur Änderung der Richtung von Zellteilungen in Blatt-epidermen, Biologisches Zentralblatt, 1983, 102, S. 323-336.

Pohlheim, 1984:

F. Pohlheim: Vergleichende Untersuchungen über Parallelvariation durch Mutation und Chimären-umlagerung bei *Hedera helix* - ein Beitrag zur Entstehung von Grünrand-Periklinalchimären mit unmaskiertem weißem Binnenfeld, Archiv für Züchtungsforschung, 1984, 15, S. 115-126.

Pohlheim, 1985:

F. Pohlheim: Zur Adventivsprossbildung an Blattstecklingen einer Monoektochimäre (grün-weiß-weiß) von *Peperomia obtusifolia*, Biologisches Zentralblatt, 1985, 104, S. 261-267.

Pohlheim, 1986:

F. Pohlheim: Über Schichten-Translokationen an periklinalchimärischen Sproßscheiteln von *Euphorbia pulcherrima* Willd, Archiv für Züchtungsforschung, 1986, 16, S. 133-141.

Pohlheim, 1989:

F. Pohlheim, Kathrin Rössel: Partnerinduktion bei chimärischen Blatt- und Blütenfarbmustern von *Pelargonium*, Tag.-Berlin Akad. Landwirtsch.-Wiss., Berlin, DDR, 1989, S. 107-115.

Pohlheim, 2003:

F. Pohlheim: Vergleichende Untersuchungen zur Sprossvariation bei *Plectranthus L'HERIT.* (Lamiaceae), Feddes Repertorium, 2003, 114, S. 488 –496.

Rasai, 1995:

S. A. Rasai, P. George, A.S. Kantharajah: Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar app and soursop): A Review, Scientia Horticulturae, 1995, 62, S. 1-14.

Rieder, 1997:

C. L. Rieder: Mitosis in vertebrate somatic cells with two spindles: Implications for the metaphase/anaphase transition checkpoint and cleavage, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94, S. 5107-5112.

Rieger, 1990:

R. Rieger, A. Michaelis, S. Takehisa: Involvement of phytochelatins in NiCl₂-triggered protection against induction of chromatid aberrations by TEM and MH in *Vicia faba* root tip meristems?, Mutation Research Letters, 1990, 244, S. 31-35.

Rieger, 1991:

R. Rieger, A. Michaelis, M. M. Green: Glossary of Genetics classical and Molecular. Berlin, Springer Verlag, Berlin, 1991.

Risler, 1961:

H Risler: Untersuchungen zur somatischen Reduktion in der Metamorphose des Steckmückendarm, Biologisches Zentralblatt, 1961, 80, S. 413-428.

Robichon, 1997:

M-P. Robichon, J-P. Renou & R. Jalouzot: Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 49, S. 209–212.

Romeis, 1989:

B. Romeis: Mikroskopische Technik (Neubearbeiten). München, Wien, Baltimore Urban & Schwarzenberg, München, Wien, 1989.

Rössel, 1990:

K. Rössel: Genetische Markierungen zur quantitativen Musteranalyse an somatischen Varianten eines homohaploiden Pelargonium Klons, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1990.

Ruth, 1985:

J. Ruth, Jr. E. J. Klekowski, O. L. Stein: Impermanent initials of the shoot apex and diplontic selection in a Juniper chimera, American Journal of Botany, 1985, 72, S. 1127-1135.

Saito, 2003:

H. Saito, K. Mizunashi, S. Tanaka, Y. Adachi, M. Nakano: Ploidy estimation in Hemerocallis species and cultivars by flow cytometry, Scientia Horticulturae, 2003, 97, S. 185-192.

Sari, 1999:

N. Sari, K. Abakand, M. Pitrat.: Comparison of ploidy level screening methods in water-melon: Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum. and Nakai., Scientia Horticulturae, 1999, 82, S. 265-277.

Satina, 1940:

S. Satina, A.F. Blakeslee, A.G. Avery: Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of Datura by means of induced polyploidy in periclinal chimeras, American Journal of Botany, 1940, 27, S. 895-905.

Schmid, 1966:

W. Schmid: Multipolar spindles after endoreduplication, Experiment Cell Research, 1966, 42, S. 201-204.

Schopfer, 1999:

P. Schopfer, A. Brennicke: Pflanzenphysiologie, Berlin, Springer, Berlin, 1999, 5, 504-505

Schwanitz, 1952:

F. Schwanitz: Einige kritische Bemerkungen zur Methode der Bestimmung der Ploidie durch Messung der Pollen- und Spaltöffnungsgröße, Züchter, 1952, 22, S. 273-275.

Sessions, 2000:

A. Sessions, M. F. Yanofsky, D. Weigel: Cell-Cell Signaling and Movement by the Floral Transcription Factors LEAFY and APETALA !, Science, 2000, 289, S. 779-781.

Simon, 2001:

R. Simon: Function of plant shoot meristems, Cell & Developmental Biology, 2001, 12, S. 357-362.

Singh, 1975:

R.J. Singh: Evolution of dominant karyotypes in vitro in Haplopappus gracilis, Caryologia, 1975, 28, S. 29-37.

Skene, 1983:

K. G. M. Skene, M. Barlass: Studies on the fragmented shoot apex of grapevine 4. Separation of phenotypes in a periclinal chimera in vitro, Journal of Experimental Botany, 1983, 34, S. 1271-1280.

Skirvin, 1976:

R.M. Skirvin, J. Janick.: Tissue culture-induced variation in scented Pelargonium spp., Journal of American Society of Horticultural Science, 1976, 101, S. 281-290.

Skirvin, 1994:

R. M. Skirvin, K. D. Mcpheeters, M. Norton: Sources and frequency of somaclonal Variation, HortScience, 1994, 29, S. 1232-1237.

Sluder, 1997:

G. Sluder, E. A. Thompson, F. J. Miller, J. Hayes, C. L. Rieder: The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry, Journal of Cell Science, 1997, 110, S. 421-429.

Smith, 1996:

C. A. Smith, E. J. Wood: Cell Biology. London Chapman & Hall, London, 1996, 2, 140-141.

Smith, 1996:

J. F. Smith, T. V. Pham: Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aseae* (Alliaceae), American Journal of Botany, 1996, 83, S. 717-726.

Smulders, 1994:

M. J. M. Smulders, W. Rus-Kortekaas, L. J. W. Gilissen: Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants, Plant Science, 1994, 97, S. 53-60.

Smulders, 1995:

Smulders, M. J. M., W. Rus-Kortekaas, L. J. W. Gilissen: Natural variation in patterns of polysomaty among individual tomato plants and their regenerated progeny, Plant Science, 1995, 106, S. 129-139.

Späth, 2000:

F. C. Späth: Unterschiedliche Formen von Wuchshemmungen und ihre Auswirkungen auf die Ausbildung von Laub- und Blütenblättern bei Sportfamilien von *Hedera helix*, *Pelargonium peltatum* und *Pelargonium zonale*, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 2000.

Speckman, 1965:

G. Speckman, Jr. JJ. Post, H. Dijkstra: The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses, Euphytica, 1965, 14, S. 225-230.

Stein, 1926:

E Stein: Untersuchung über die Radiomorphose von *Antirrhinum*, Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre, 1926, 43, S. 1-87.

Stein, 1927:

E. Stein: Über experimentelle Umstimmung der Reaktionsnorm bei *Antirrhinum*, Biologisches Zentralblatt, 1927, 47, S. 705-722.

Stein, 1930:

E. Stein: Weitere Mitteilung über die durch Radiumbestrahlung induzierten Gewebe-Entartungen in *Antirrhinum* und ihr erbliches Verhalten, Biologisches Zentralblatt, 1930, 50, S. 129-158.

Stein, 1936:

E. Stein: Erbliche, durch Radiumbestrahlung erzeugte Zell- und Gewebeentartung bei Löwenmauls (*Antirrhinum majus*), Naturwissenschaften, 1936, 24, S. 237-242.

Stein, 1942:

E. Stein: Cytologische Untersuchung an *Antirrhium majus* mut. *cancroidea*. Endomitose-Entwicklung, Chromosoma, 1942, 2, S. 308-333.

Stewart, 1970:

R. N. Stewart, L. G. Burk: Independence of Tissues derived from apical Layers in Ontogeny of the Tobacco Leaf and Ovary, *American Journal of Botany*, 1970, 57, S. 1010-1019.

Stewart 1970:

R.N. Stewart, H. Dermen: Somatic genetic analysis of the apical layer of chimeral sports in *Chrysanthemum* by experimental production of adventitious shoots, *American Journal of Botany*, 1970, 57, S. 1061-1071.

Stewart, 1975:

R. N. Stewart, H. Dermen: Flexibility in Ontogeny as Shown by the Contribution of the shoot apical Layers to leaves of periclinal Chimeras, *American Journal of Botany*, 1975, 62, S. 935-947.

Stewart, 1978:

R. N. Stewart: Ontogeny of the primary body in chimeral forms of higher plants, In I.M. Sussex and S. Subtelny (ed.), *The Clonal Basis of Development*, Academic Press, New York, 1978, S. 131-159.

Straub, 1941:

J. Straub: Wege zur Polyploidie: Eine Anleitung zur Herstellung von Pflanzen mit Riesenwuchs, Berlin, Verlag von Gerüder Bornträger, Berlin, 1941, S. 21-23.

Swartz, 1991:

H.J. Swartz: Post culture behaviour: genetic and epigenetic effects and related problems. In P. C. Debergh, and R. H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation: Technology and Application*, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, London, 1991, S. 95-121.

Tan, 1973:

G. Y. Tan, G. M. Dunn: Relationship of stomatal length and frequency and pollen grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyess, *Crop Science*, 1973, 13, S. 332-334.

Tilney-Bassett, 1963:

R. A. E. Tilney-Bassett: The Structure of periclinal Chimeras, *Heredity*, 1963, 18, S. 265-284.

Tilney-Bassett, 1986:

R.A.E. Tilney-Bassett: *Plant Chimeras*, London, E. Arnold, London, 1986, S. 199.

Torre, 1975:

De la Torre, G. Gomenez Martin: The nucleolus in the induced amitosis, *Journal of Experimental Botany*, 1975, 26, S. 713-721.

Traas, 1998:

J. Traas, M. Hulskamp, E. Gendreau, H. Hofte: Endoreduplication and development: rule without dividing?, *Current Opinion of Plant Biology*, 1998, 1, S. 498-503.

Tschermak-Woess, 1971:

E. Tschermak-Woess: Endomitose, In H. W. Altmann (ed.), *Der Zellkern, Handb. der allgemeinen Pathologie*. 2/2/1, Springer Heidelberg, 1971, S. 569-625.

Valente, 1998:

P. Valente, Weihai Tao, Jean-Pierre Verbelen: Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of tobacco, *Plant Science*, 1998, 134, S. 207-215.

Vandenhout, 1995:

H. Vandenhout: Effect of ploidy on stomata and other quantitative traits in plaitain and banana hybrid, *Euphytica*, 1995, 83, S. 117-122.

Visser, 1992:

C. Visser, J. A. Qureshi, R. Gill, K. Saxena: Morphoregulatory Role of Thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl culture, *Plant Physiology*, 1992, 99, S. 1704-1707.

von Guttenberg, 1960:

H. von Guttenberg: Grundzüge der Histogenese höherer Pflanzen 1. Die Angiospermen. Handbuch der Pflanzenanatomie, Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1960.

Warnke, 1982:

L. Warnke: Die Amitose in Oligodendrogliomium, Dissertation, Universität zu Köln, 1982.

Wheatley, 1996:

S. P. Wheatley, Y. Wang: Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells, *Journal of Cell Biology*, 1996, 135, S. 981-989.

Wilson, 1950:

J.W. Wilson, E.H. Leduc: Abnormal Mitosis in mouse liver, *American Journal of Anatomy*, 1950, 86, S. 51-73.

Winkler, 1907:

H. Winkler: Über Pfropfbastarde und pflanzliche Chimären, *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft*, 1907, 25, S. 567-576.

Zonneveld, 2000:

Ben J.M. Zonneveld, Frank Van Iren: Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras, *Euphytica*, 2000, 111, S. 105–110.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin erkläre ich, bisher weder die gleiche noch eine andere Dissertation an einer anderen Universität oder Hochschule eingereicht zu haben.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die meine Dissertation ermöglicht haben. Ich danke Herrn Prof. Dr. F. Pohlheim für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Besonders danke ich Frau Prof. M.D. Sacristan und Frau Dr. I. Pinker für die fachliche Diskussion.

Mein allerherzlichster Dank gilt Frau Dr. C. Lehmann, Frau Dr. S. Plaschil und Herr P. Grieger für ihre stets hilfsbereite Unterstützung, fachlichen Anregungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Sehr dankbar für die angenehme Zusammenarbeit im Fachgebiet und für ihre Unterstützung bin ich Frau Binting, Frau Rentsch, Frau Meier, Frau Seyfert, Frau S. Petrova, Frau A. Zindl, Frau S. Wieland, Herr M. Hansen, Frau A. Hanemann und Frau E. Luchmann

Ein ganz besonderer Dank gilt Südwest Universität für Wissenschaften und Technik in China, die mich unterstützt hat. Das gilt auch meiner Frau Xu, Wenshi und meiner Tochter Xia Li, die mich seit jeher in allen Dingen unterstützt und bestärkt haben.

In gleicher Weise danke ich allen Freunden und Kollegen für ihre moralische Unterstützung.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Vorträge

Publikationen:

1. „Die Analyse der Bastardwüchsigkeit zwischen Baumwollarten“, China Baumwolle, Nr. 6, 1985
2. „Die Untersuchungen des resistenten Derivationssystems der männlichen Sterilitätslinie OA“, China Baumwolle, Nr. 3, 1986
3. “ Observation of High-Frequency Occurrence of Chimeral Adventitious Shoots in Tissue Culture from the Chimeral Tissues of *Pelargonium zonale*”. HortScience , 2005 (im Druck)

Buchveröffentlichungen:

1. „Verarbeitung von Agrarprodukten“, mit Dong Shaohua, Verlag für Wissenschaft und Technik Sichuan, China, 1989
2. „Das System der Verbreitung von Methoden in der Landwirtschaft“, mit Jan Naijun, Xu Nenfei, Yu Wenjin, Fong Xiaorong, Zhang Lin, Verlag für Wissenschaft und Technik, Sichuan, China, 1989

Vorträge bei Doktorandenseminar für Gartenbauwissenschaften an HU, Berlin

1. Untersuchungen zur Polyploidisierung der somatischen Zellen von Klon 5/74/2 bei *Pelargonium zonale*
2. Beobachtungen zur Multiploidisierung der Epidermis von Klon 5/74/2 bei *Pelargonium zonale*
3. Untersuchung zur somatischen Variabilität in den Teilklonen von *Pelargonium zonale* `Kleiner Liebling`